



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA



**Germinación *in vitro* de cuatro especies
de orquídeas en medios enriquecidos con
complejos naturales**

TESIS

Que para obtener el título de:

Bióloga

Presenta:

Morales Ceballos Ana Karen

Directora de Tesis: M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales

Unidad de Investigación en Biología Vegetal

Ciudad de México, Abril 2018

Proyecto PAPIME: PE207716

Ciudad de México, 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

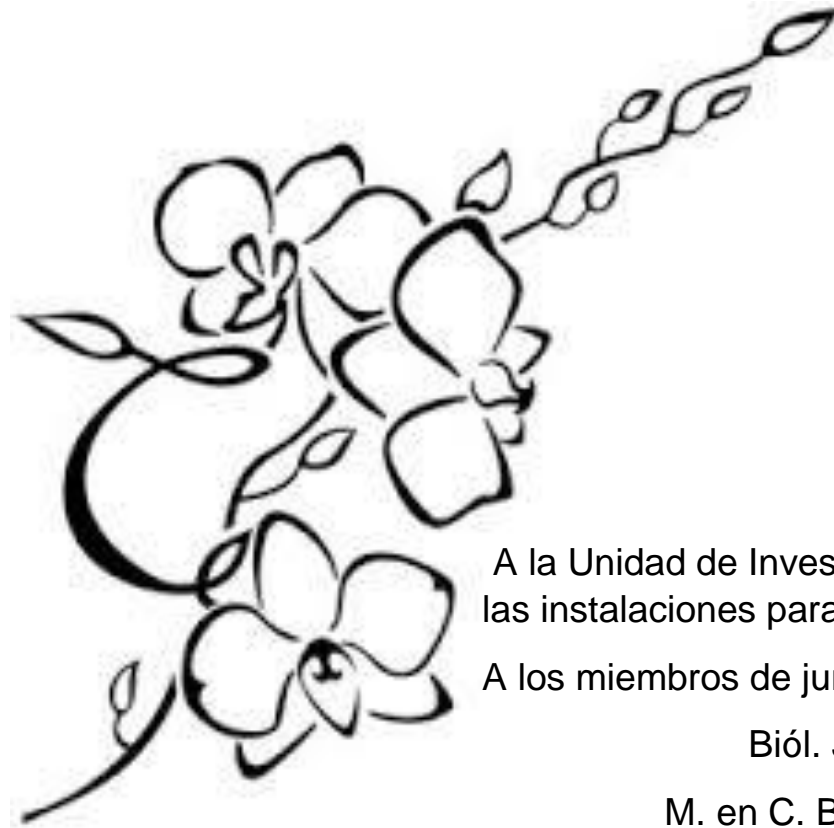


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Agradecimientos

A la Unidad de Investigación en Biología Vegetal por facilitar las instalaciones para la realización de este trabajo.

A los miembros de jurado:

Biól. Juan Romero Arredondo

M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales

M. en C. Florencia Becerril Cruz

M. en C. Genaro Montaña Arias

Dra. Hortensia Rosas Acevedo

Por las observaciones realizadas que enriquecieron esta investigación.

A Juan Carlos Flores Mendoza por su apoyo para la obtención de las micrografías electrónicas.

A el Biól. Juan Romero Arredondo por sus revisiones y colaboración en el material fotográfico.

A la M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales directora de tesis, por su paciencia y experiencia brindada durante esta investigación.



Dedicatoria

A mis padres que, por siempre estar ahí.

A toda mi familia.

A Juan Romero por siempre estar conmigo.

“Eres la estrella más maravillosa que he conocido en toda mi vida”

“Quiero hacer cosas imposibles “

TABLA DE CONTENIDO

	Página
Resumen	I
Introducción	1
Marco teórico	2
Medio de cultivo	5
Cuerpos parecidos a protocormo (PLB's)	10
Descripción de las especies estudiadas	13
Justificación	17
Hipótesis	17
Objetivos	17
Objetivo general	17
Objetivo particular	17
Material y método	18
Resultados y análisis de resultados	25
Discusión	55
Conclusiones	63
Bibliografía	64
Anexos	71
Anexo I	72
Composición de los medios de cultivo Kao & Mychayluk (KM) y Murashige & Skoog (MS)	
Anexo II	74
Composición del agua de coco y jugo de piña	
Anexo III	76
Distribución normal para el índice de desarrollo	
Anexo IV	80
Índice de desarrollo	
Anexo V	84
Análisis de costos de tratamientos utilizados	
Paquete tecnológico	85

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

µg: Microgramos	K: Potasio
ABA: Ácido abscísico	K₂O: Potasio soluble
AC: Agua de coco	KCl: Cloruro de potasio
AIA: Ácido indol-3-acético	Kg: Kilogramos
ANA: Ácido naftalenacético	KH₂PO₄: Fosfato monopotásico
ANDEVA: análisis de varianza	KI: Yoduro de potasio
B: Boro	Kin: Kinetina
BAP: 6-benzilamino-purina	KM: Kao & Michailuck
Ca: Calcio	KNO₃: Nitrato de potasio
CaCl₂ 2H₂O: Cloruro de calcio	mg/L: miligramos por litro
CK: Citoquininas	Mg: Magnesio
Cl: Cloro	mg: Miligramos
CoCl₂ 6H₂O: Cloruro de cobalto	MgSO₄: Sulfato de magnesio
Cu: Cobre	mm: milímetros
CuSO₄ 5H₂O: Sulfato de cobre	mm²: milímetros cuadrados
FAA: Formaldehido-ácido acético glacial-agua	Mn: Manganeseo
Fe: Hierro	MnSO₄ H₂O: Sulfato de manganeseo
g: Gramos	Mo: Molibdeno
GA: Giberelinas	MS: Murashige & Skoog
h: Horas	N: Nitrógeno
H₃BO₃: Ácido bórico	Na₂ EDTA 2H₂O: Acido Tetracético Etilen Diamina
ID: Índice de desarrollo	Na₂Mo₄ 2H₂O: Molibdato de sodio
Izta-Popo: Parque Nacional Iztaccíhuatl-Popocatépetl	NaOCl: Hipoclorito de sodio
JA: Jasmonatos	NH₄NO₃: Nitrato de amonio
JP: Jugo de piña	Ni: Níquel
	N-NH₄: Nitrógeno amoniacal

N-NO₃: Nitrato de nitrógeno

P: Fósforo

P₂₀₅: Fosfato disponible

PLB's: Protocom like body

S: Azufre

SA: Ácido salicílico

TTC: 2,3,5-trifeniltetrazolio

UIBV: Unidad de Investigación en Biología vegetal

Ur-N: Urea nitrogenada

v/v: volumen por volumen

Zn: Zinc

ZnSO₄ 7H₂O: Sulfato de zinc

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Micrografías que muestran la diversidad morfológica de las semillas de orquídeas	2
Figura 2. Estadios ontogénicos de <i>Laelia</i> sp.	3
Figura 3. Formación de PLB's y desarrollo de plántulas de <i>Euchile mariae</i> a partir del cultivo <i>in vitro</i> de secciones apicales y basales de protocormos en medio MS modificado	11
Figura 4. <i>Laelia autumnalis</i> (Llave & Lex.)	13
Figura 5. <i>Govenia superba</i> (La Llave & Lex.) Lindl	14
Figura 6. <i>Prosthechea cochleata</i> (L.) W.E.Higgins	15
Figura 7. <i>Bletia neglecta</i>	16
Figura 8. Estadios ontogénicos propuestos por Batigyna y colaboradores	20
Figura 9. Metodología general	24
Figura 10. Prueba de viabilidad con TTC	25
Figura 11. Porcentaje de germinación <i>L. autumnalis</i>	26
Figura 12. Porcentaje de germinación <i>Bletia neglecta</i>	27
Figura 13. Porcentaje de germinación de <i>P. cochleata</i>	28
Figura 14. Porcentaje de germinación <i>G. superba</i>	29
Figura 15. Estadios de desarrollo propuestos para evaluar la germinación <i>in vitro</i>	30
Figura 16. Gráfica de medias e intervalos al 95% LSD. Índice de desarrollo de <i>L. autumnalis</i> considerando el tiempo del cultivo, independientemente de los tratamientos empleados	31
Figura 17. Gráfica de medias e intervalos al 95% LSD. Índice de desarrollo de <i>L. autumnalis</i> en tratamientos alternativos independientemente a los días de cultivo	32
Figura 18. Índice de desarrollo para <i>L. autumnalis</i>	34

Figura 19. Gráfica de medias e intervalos al 95% LSD. Índice de desarrollo de <i>B. neglecta</i> considerando el tiempo del cultivo, independientemente de los tratamientos empleados	35
Figura 20. Gráfica de medias e intervalos al 95% LSD. Índice de desarrollo de <i>B. neglecta</i> en tratamientos alternativos independientemente a los días de cultivo	36
Figura 21. Índice de desarrollo para <i>B. neglecta</i>	37
Figura 22. Gráfica de medias e intervalos al 95% LSD. Índice de desarrollo de <i>P. cochleata</i> considerando el tiempo del cultivo, independientemente de los tratamientos empleados	38
Figura 23. Gráfica de medias e intervalos al 95% LSD. Índice de desarrollo de <i>P. cochleata</i> en tratamientos alternativos independientemente a los días de cultivo	39
Figura 24. Índice de desarrollo para <i>P. cochleata</i>	40
Figura 25. Gráfica de medias e intervalos al 95% LSD. Índice de desarrollo de <i>G. superba</i> considerando el tiempo del cultivo, independientemente de los tratamientos empleados	41
Figura 26. Gráfica de medias e intervalos al 95% LSD. Índice de desarrollo de <i>G. superba</i> en tratamientos alternativos independientemente a los días de cultivo	42
Figura 27. Índice de desarrollo para <i>G. superba</i>	42
Figura 28. Origen y desarrollo de PLB's	44
Figura 29. Cultivo de <i>L. autumnalis</i> en PETERS _{100%}	45
Figura 30. Etapas de desarrollo de PLB's en <i>B. neglecta</i>	46
Figura 31. Plántulas de <i>L. autumnalis</i> con alta proliferación de raíces y presencia de velamen, en tratamiento MS _{50%} , a partir de la diferenciación de PLB's	47
Figura 32. Protocormos de <i>G. superba</i> cultivados en KM _{12%} con la presencia de PLB's en la base, a los 51 días de cultivo, siguiendo la vía indirecta de diferenciación	47
Figura 33. Protocormos de <i>P. cochleata</i> con el desarrollo de PLB's	

en cultivo <i>in vitro</i>	48
Figura 34. Semilla de <i>Laelia autumnalis</i>	49
Figura 35. Origen de PLB's en distintas etapas de desarrollo en las especies estudiadas	50
Figura 36. Desarrollo de PLB's alrededor del protocormo original	51
Figura 37. Formación de estructuras embrionarias en la planta madre	51
Figura 38. Formación de radícula	52
Figura 39. Gotas de lípidos distribuidas aleatoriamente	53
Figura 40. Identificación de almidones	53
Figura 41. Identificación de proteínas	54
Figura 42. Proceso de formación de PLB's a partir de cortes de protocormo en <i>Cymbidium</i>	59
Figura 43. Formación de PBL's a partir de un solo protocormo	60
Figura 44. Gráfica de distribución normal del ID para <i>L. autumnalis</i>	76
Figura 45. Gráfica de distribución normal del ID para <i>B. neglecta</i>	77
Figura 46. Gráfica de distribución normal del ID para <i>P. cochleata</i>	78
Figura 47. Gráfica de distribución normal del ID para <i>G. superba</i>	79

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Semillas de orquídeas para la germinación <i>in vitro</i>	18
Cuadro 2. Composición de los medios de cultivo utilizados como tratamientos para la germinación <i>in vitro</i> por especie	19
Cuadro 3. Preparación de 100 mL de FAA al 100%	21
Cuadro 4. Proporción de mezcla etanol absoluto-xilol, para inclusión en parafina	22
Cuadro 5. Preparación de 100 mL de solución para inclusión de parafina	22
Cuadro 6. Porcentaje de germinación de las especies estudiadas, de acuerdo con la prueba de TTC	25
Cuadro 7. Composición de los medios de cultivo Kao & Mychayluk (KM) y Murashige & Skoog (MS)	72
Cuadro 8. Prueba de normalidad para ID de <i>L. autumnalis</i>	76
Cuadro 9. Prueba de normalidad para ID de <i>B. neglecta</i>	77
Cuadro 10. Prueba de normalidad para ID <i>P. cochleata</i>	78
Cuadro 11. Prueba de normalidad para ID de <i>G. superba</i>	79
Cuadro 12. Análisis de varianza pada el índice de desarrollo de <i>L.autumnalis</i> ..	80
Cuadro 13. Prueba de rangos multiples para índice de desarrollo con respecto a tiempo (días) para <i>L.autumnalis</i>	80
Cuadro 14. Prueba de rangos múltiples para Índice de desarrollo con respecto al tratamiento para <i>L.autumnalis</i>	80
Cuadro 15. Análisis de varianza para el índice de desarrollo de <i>B. neglecta</i>	80
Cuadro 16. Prueba de rangos múltiples para índice de desarrollo con respecto al tiempo (días) para <i>B. neglecta</i>	81
Cuadro 17. Índice de desarrollo de <i>B. neglecta</i> en tratamientos alternativos independientemente a los días de cultivo	81
Cuadro 18. Análisis de varianza para el índice de desarrollo de <i>P. cochleata</i> ...	81
Cuadro 19. Índice de desarrollo de <i>P. cochleata</i> considerando el tiempo del cultivo, independientemente de los tratamientos empleados	82

Cuadro 20. Índice de desarrollo de <i>P.cochleata</i> en tratamientos alternativos independientemente a los días de cultivo	82
Cuadro 21. Análisis de varianza del índice de desarrollo para <i>G. superba</i> ..	82
Cuadro 22. Índice de desarrollo de <i>G. superba</i> considerando el tiempo del cultivo, independientemente de los tratamientos empleados	83
Cuadro 23. Índice de desarrollo de <i>G. superba</i> en tratamientos alternativos independientemente a los días de cultivo	83
Cuadro 24. Costos por componente para medio de cultivo	84
Cuadro 25. Costo de tratamiento por litro y comparación de un tratamiento con el uso de hormonas comerciales	84

Resumen

Con la creciente actividad antropogénica y la comercialización desmedida, la orquideoflora mexicana se ha visto severamente perjudicada, por lo que se han implementado alternativas para su conservación. En la presente investigación se indujo la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de cuatro especies de orquídea: *Laelia autumnalis*, *Bletia neglecta*, *Govenia superba* y *Prosthechea cochleata*. Durante un periodo de 134 días de cultivo se describió la ontogenia del embrión durante el proceso de germinación, estableciendo el índice de desarrollo y determinando al término del cultivo, el máximo estadio ontogénico alcanzado. Se compararon siete tratamientos a base de sales inorgánicas analíticas, Kao & Michayluk (KM), Murashige & Skoog (MS) y con fertilizante comercial, PETERS® (P) a diferentes concentraciones, adicionados con agua de coco y jugo de piña, de manera conjunta. Las semillas germinaron a partir de los treinta días de cultivo en todos los tratamientos. El máximo porcentaje de germinación fue de 100% en todos los medios de cultivo para la mayoría de las especies, excepto para *G. superba*, en la cual el porcentaje de germinación fue de 37% en el medio KM12%. Durante el proceso de germinación se describieron nueve estadios ontogénicos: 0. Semilla sin germinar, 1. Semilla hinchada y verde, 2. Protocormo, 3. Protocormo con primordio foliar, 4. Protocormo con rizoides, 5. Protocormo con una hoja, 6. Protocormo con dos hojas, 7. Protocormo con tres hojas, 8. Plántula con raíces.

A partir de los 30 días de cultivo fue evidente la formación de cuerpos parecidos a protocormos (PLB's), en la superficie del protocormo, los cuales se diferenciaron siguiendo dos rutas morfogénicas, directa e indirecta, para la formación de plántulas completas.

Por medio de cortes histológicos y micrografías electrónicas de barrido fue posible la identificación del origen y desarrollo de los PLB's, los cuales surgen de la epidermis de los protocormos.

La identificación mediante tinciones específicas para contenidos celulares (Safranina-Verde rápido, Azul negro de naftol y Lugol) permitió determinar la predominancia en las células de proteínas, como sustancia de reserva y resaltando la ausencia de almidón, en etapas tempranas de desarrollo.

Con este estudio se establecieron tres protocolos de germinación *in vitro* que cumplen con los requerimientos específicos de cada especie. Así como también se indujo la formación de PLB's en las cuatro especies y en todos los tratamientos probados. Los PLB's son considerados como el objetivo a alcanzar por los micropropagadores de orquídeas a nivel comercial, por su rápido desarrollo *in vitro*.

Introducción

Debido a la creciente actividad antropogénica, el cambio de uso de suelo y la comercialización desmedida, tanto la flora como la fauna se han visto afectadas. Distintas alternativas de conservación como el cultivo *in vitro*, es utilizado exitosamente en la recuperación de especies vegetales endémicas, amenazadas, o con un valor comercial.

La familia Orchidaceae es considerada una de las familias más diversas dentro de plantas con flor, con 800 géneros descritos y alrededor de 25 mil especies reconocidas a nivel mundial (Chugh, Guha, & Rao, 2009; Ortega-Larrocea, Martínez-Palacios, & Chávez-Aviña, 2007). Se distribuyen en la mayoría de los continentes exceptuando la Antártida, presentando una mayor diversidad en las regiones tropicales.

Las orquídeas se cultivan principalmente como plantas ornamentales, son apreciadas no sólo por su belleza exótica, algunas son empleadas como hierbas medicinales y alimentos (tubérculos de *Cynorchis* y *Eulophia*) por muchas culturas y tribus diferentes. Varias especies de los géneros *Anoectochilus*, *Goodyera*, *Ludisia* y *Macodes* son cultivadas especialmente por su follaje. La *Vanilla planifolia* es un ejemplo de una orquídea utilizada como especia (Arditti, 1992).

México se encuentra situado en el límite norte del trópico americano, albergando una notable riqueza de orquídeas; de las cuales han sido registradas alrededor de 1260 especies y 170 géneros (Hágsater et al., 2005; Soto & Salazar, 2008), el porcentaje de endemismo es alto, aproximadamente 40% de las especies, 8% de géneros, delimitados a cadenas montañosas o a zonas de extensión reducida (Luna, 2016).

En la FES Zaragoza, la Unidad de Investigación en Biología vegetal se realizan estudios con el objetivo de conocer y actualizar la orquideoflora de los Parques Nacionales, así como establecer protocolos de propagación *in vitro* de las orquídeas. Entre los parques estudiados se encuentra el Parque Nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl (Izta-Popo), que presenta 36 especies y 20 géneros (Luna, 2016).

Dentro de las especies que se pueden encontrar dentro del parque están: *Laelia autumnalis*, *Govenia superba*, *Prosthechea cochleata* y *Bletia neglecta*; que, aunque solo *L. autumnalis* y *B. neglecta* son endémicas y ninguna se encuentra en alguna categoría de riesgo, son parte de ecosistemas amenazados y hay poca información acerca de su propagación.

Marco teórico

Semillas de orquídeas

Las semillas de las orquídeas se caracterizan por ser muy pequeñas por lo que son llamadas “semillas polvo” o de “polvillo”, éstas son producidas en grandes cantidades que van de un millón hasta tres millones por fruto (cápsula) en las especies tropicales; tienen una estructura muy simple.

El peso de las semillas varía entre 0,3 y 15 μg , por lo que son dispersadas fácilmente por el viento (Alcaraz-Ariza & García-Serrano, 2005).

El embrión consta de alrededor de doscientas células, es de forma helicoidal, no diferenciado en la epidermis y parénquima, contiene reservas de lípidos y proteínas, sin embargo, carece de almidón, aunque se pueden encontrar algunas trazas (Arditti, 1992); por lo que es correcto considerar que carecen de endospermo.

La testa es membranosa, frecuentemente transparente, y en ocasiones pigmentada, presenta características de interés taxonómico (forma y ornamentación).

Las semillas de orquídea muestran una gran diversidad en morfología, ya que esta varía dependiendo del género (fig. 1).

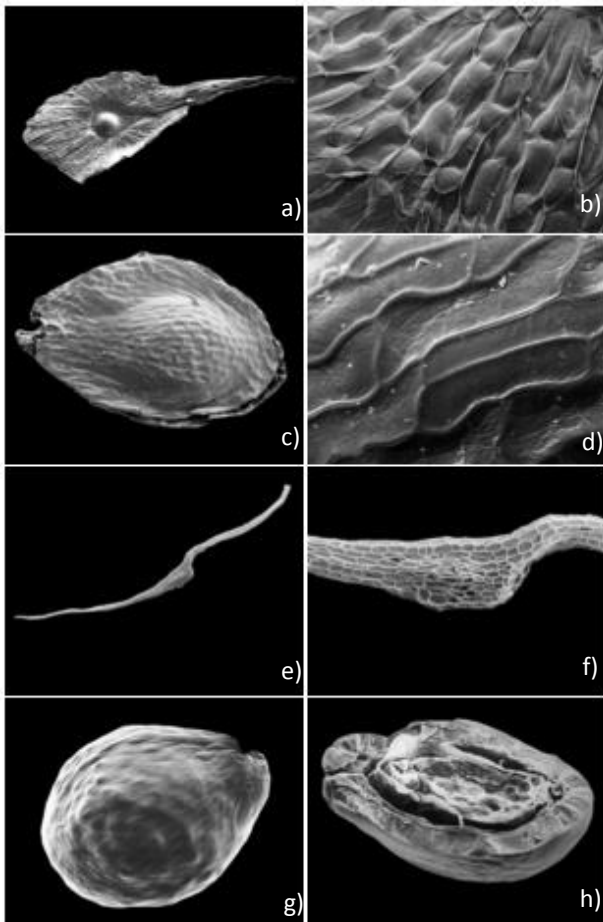


Figura 1. Micrografías que muestran la diversidad morfológica de las semillas de orquídeas. a, b: *Galeola nudifolia*, longitud: 1500 μm ; c, d: *Galeola septentrionalis*, longitud: 1500 μm ; e, f: *Lecanorchis multiflora*, longitud: 2400 μm ; g, h: *Vanilla planifolia*, sección longitudinal a través de una semilla madura que muestra la testa espesa esclerificada, longitud: 500 μm . Tomado de Barthlott, Große-Veldmann, & Korotkova, 2014.

Germinación

La germinación de las orquídeas se refiere a los estadios secuenciales del proceso de desarrollo (fig. 2). Para que se lleve a cabo la germinación, es necesario que las semillas absorban agua (imbibición) a través de la testa, lo que conlleva a un aumento de volumen del embrión, seguido por la división celular en la región anterior, provocando la ruptura de la testa, lo que da lugar a una nueva estructura cónica o esférica llamada protocormo, en la región apical se formará el primordio foliar, seguido por la formación de rizoides alrededor de la parte inferior. A partir del primordio foliar se desarrollan las hojas fotosintéticas y en la parte basal del protocormo se forman las raíces, formando así una planta completa (Barba, Luna, & Romero, 2002).

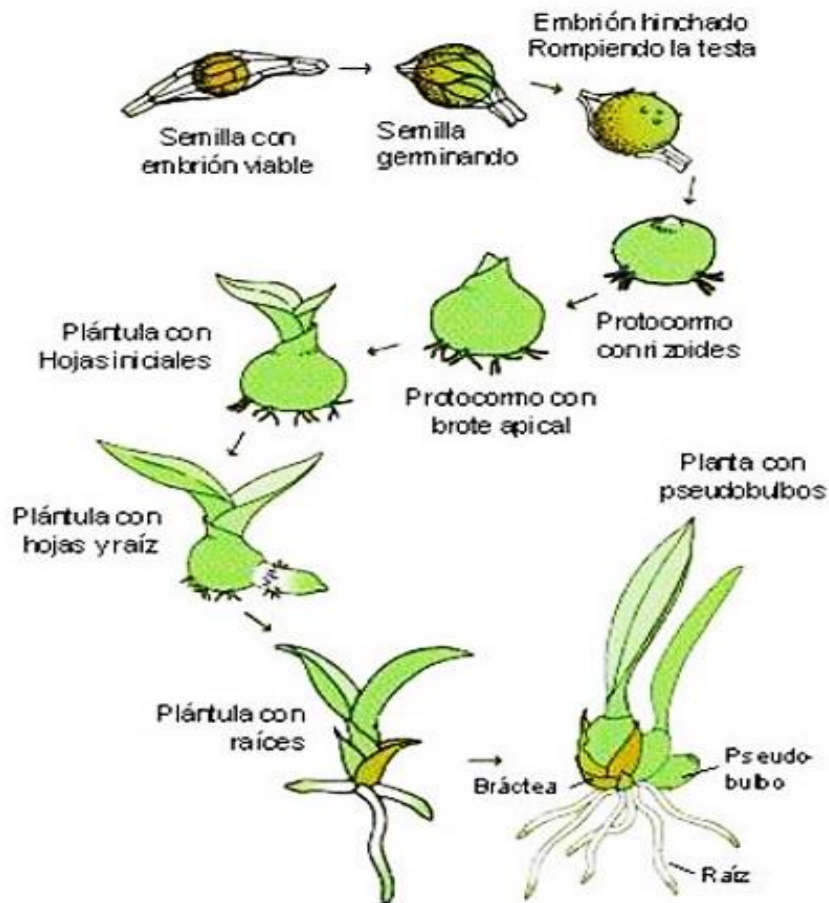


Figura 2. Estadios ontogénicos de *Laelia* sp. propuestos por Seaton & Ramsay, 2015.

Un conjunto de condiciones debe cumplirse para que una semilla germine. Todas las orquídeas requieren una asociación micorrízica para la germinación de sus semillas, principalmente con hongos basidiomicetos del grupo de *Rhizoctonia* (Rasmussen, Dixon, Jersáková, & Těšitelová, 2015).

Esta dependencia se asocia con las mínimas cantidades de nutrientes almacenados en las diminutas semillas de las orquídeas (Arditti & Ghani, 2000).

Sin embargo, los hongos del grupo de *Rhizoctonia* son bien conocidos por sus capacidades patogénicas en muchos grupos diferentes de plantas.

El porcentaje de semillas que llegan a germinar en condiciones naturales es muy reducido (5-10%), por lo que se han implementado tecnologías para multiplicación masiva de las especies, por lo que la germinación *in vitro* es una alternativa para la germinación de semillas de orquídea y puede ser clasificada en simbiótica o asimbiótica.

Tipos de Germinación *in vitro*

Germinación simbiótica

Las semillas son sembradas con una pequeña porción del hongo micorrízico apropiado y aislado. El hongo crece en el medio, coloniza a las semillas en proceso de germinación y se origina una relación simbiótica que se espera alimente al protocormo hasta que este produzca hojas y se vuelva autotrófo (McKendrick, 2000).

Germinación asimbiótica

Se usa principalmente para la propagación de cualquier tipo de orquídeas. Utilizando un medio de cultivo con nutrientes orgánicos e inorgánicos y azúcares en cantidades disponibles suficientes (McKendrick, 2000).

Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos se define como un conjunto de técnicas en las que un inóculo (pequeña porción vegetal con al menos 20 células que pueden ser protoplastos – células desprovistas de pared celular, tejidos u órganos) se cultiva asépticamente en un medio de cultivo artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (Echenique, Hopp, Levitus, Mroginski, & Rubinstein, 2010).

Las primeras investigaciones para establecer un diseño de medio de cultivo, fueron realizados por Sacks (1860) y Knops (1861), ellos observaron que los principales nutrientes de las plantas superiores eran sustancias inorgánicas. Basándose en esto prepararon una solución nutritiva que las contenía (Sharry, Adema, & Abedini, 2015).

Durante los años siguientes los experimentos para establecer el cultivo de tejidos siguieron desarrollándose, desde la diferenciación celular hasta el cultivo de ápices radiculares; éstos no fueron exitosos, ya que los medios de cultivo no contenían ningún regulador de crecimiento, pues esos compuestos eran desconocidos en ese momento.

Fue en 1922 cuando se logró el primer experimento exitoso: la germinación *in vitro* de semillas de orquídeas (Yam & Arditti, 2009). Posterior a la germinación,

las plántulas fueron transferidas a un medio de cultivo en condiciones asépticas, y se mantuvieron libres del ataque de patógenos (hongos, virus y bacterias).

Medio de cultivo

Los órganos y tejidos vegetales se cultivan *in vitro* en medios artificiales que suministran los nutrientes necesarios para su crecimiento.

El éxito del cultivo de tejidos vegetales está estrechamente relacionado con la composición del medio de cultivo utilizado.

Un medio de cultivo se define como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición específica de los cultivos.

Existen numerosos medios de cultivo, cada uno comprende entre 6 y 40 compuestos.

Actualmente se encuentran más de 80 medios comerciales que se venden listos para micropropagación y la literatura menciona alrededor de 2000 formulaciones diferentes (Echenique et al., 2010).

El medio de cultivo más utilizado es la formulación propuesta por Murashige & Skoog (1962). Este medio fue desarrollado para el crecimiento óptimo de callo del tabaco. Actualmente es el más utilizado en el cultivo de tejidos vegetales a diferentes concentraciones dependiendo de la especie.

Según Sharry, Adema, y Abedini (2015) básicamente, los medios de cultivo se componen de:

- Macronutrientes y micronutrientes
- Fuente de carbono
- Vitaminas
- Sustancias reguladoras del crecimiento (fitohormonas)
- Material de soporte (Agente gelificante)

Macronutrientes y micronutrientes

Las plantas deben obtener del sustrato elementos en diferentes cantidades para poder desarrollarse. Las plantas absorben los nutrientes inorgánicos que requieren de los suelos casi en su totalidad como iones, estos nutrientes se añaden al medio de cultivo en forma de sales.

Según Epstein (1971) un elemento puede ser considerado esencial para el crecimiento de la planta si:

- La planta no completa su ciclo de vida sin la presencia de este
- Tiene una acción específica y no puede ser sustituida

- Su efecto sobre el organismo es directo
- Es un constituyente de una molécula esencial

Macronutrientes (g):

- Nitrógeno (N)
- Potasio (K)
- Calcio (Ca)
- Fósforo (P)
- Magnesio (Mg)
- Azufre (S)

Micronutrientes (mg):

- Hierro (Fe)
- Níquel (Ni)
- Cloro (Cl)
- Manganeseo (Mn)
- Zinc (Zn)
- Boro (B)
- Cobre (Cu)
- Molibdeno (Mo)

Fuentes de carbono

Como fuentes de carbono más comunes se encuentran los azúcares. Entre ellos, es común el empleo de monosacáridos como la glucosa, disacáridos como la lactosa y polisacáridos como el almidón.

La sacarosa y la glucosa se utilizan en el cultivo de tejidos de la mayoría de las especies. La fructuosa, maltosa, celobiosa, rafinosa y otras, se les usa como fuente de carbono para algunas variedades de tejidos. La mejor fuente de carbohidratos, y la más utilizada en cultivos es la sacarosa (2-5%). Varios informes señalan que la sacarosa se hidroliza activamente a fructuosa y glucosa por la invertasa de la pared celular. Las carbohidrasas hidrolizan el almidón, maltosa o rafinosa en monosacáridos (Sharry et al., 2015).

Vitaminas

Las vitaminas son sintetizadas por las plantas y son indispensables para su crecimiento y diferenciación cumpliendo un rol catalítico en el metabolismo celular.

Cuando las células de plantas superiores son cultivadas *in vitro*, la ausencia de vitaminas constituye un factor limitante del crecimiento. No obstante, estas necesidades dependen de la especie considerada. Las vitaminas que son

adicionadas más usualmente en medios de cultivo son: tiamina-HCl, ácido nicotínico, piridoxina-HCl, biotina, ácido fólico, ácido pantoténico y riboflavina.

- Tiamina (vitamina B1): Durante el ciclo vital de las plantas en condiciones normales, la tiamina se sintetiza en las hojas y se almacena en los cotiledones de la semilla. Durante la esterilización por autoclave se descompone en pirimidina y tiazol; sin embargo, la mayoría de los tejidos son capaces de sintetizar tiamina a partir de los productos de su descomposición. Se utiliza en concentraciones cercanas a 0.4 mg/L.
- Piridoxina (vitamina B6): Participa en la síntesis de purinas y pirimidinas y, por lo tanto, en el metabolismo de los ácidos nucleicos. Estimula el crecimiento vegetal interviniendo en las reacciones de energía.
- Niacina (vitamina B3): desempeña un papel importante en la respiración porque es un componente de las coenzimas I y II, grupos portadores de hidrógeno en la fase respiratoria de deshidrogenación.
- Inositol o myo-inositol: es un azúcar alcohol que está incluido dentro del complejo de la vitamina B. Se agrega en casi todos los medios de cultivo a razón de 100 mg/L y como suplemento de la sacarosa. Es parte integral de varios tipos de membranas de algunos organelos como los cloroplastos (Sharry et al., 2015)

Sustancias reguladoras del crecimiento (fitohormonas)

Las plantas han desarrollado estrategias complejas para lograr su supervivencia en un medio ambiente en constante cambio.

Estos compuestos participan en la regulación de múltiples procesos fisiológicos como la germinación, el enraizamiento, los movimientos trópicos, la tolerancia a diferentes tipos de estrés bióticos y abióticos, la etapa de floración, la maduración de frutos y la senescencia, entre otros.

Las fitohormonas se producen en las células de la planta, sin formar glándulas y se definen como compuestos orgánicos que se sintetizan en una parte de la planta, y se trasladan a otro sitio donde ejercen su acción fisiológica en muy bajas concentraciones, por debajo de la concentración de otros compuestos como nutrientes y vitaminas.

De acuerdo con su estructura y función fisiológica, las hormonas han sido clasificadas en varios grupos que comprenden a las auxinas, citoquininas (CK), ácido abscísico (ABA), giberelinas (GA), etileno, jasmonatos (JA), ácido salicílico (SA), brasinosteroides, poliaminas (Cruz Aguilar, Melgarejo, & Romero, 2006).

Material de soporte

Hurtado y Merino (1987) señalan que el agar es el material de soporte más ampliamente usado en el cultivo de tejidos, ya que proporciona al medio una consistencia de gel húmedo que sirve como soporte al inóculo. Sin embargo, fisiológicamente no es inerte, puesto que es una fuente de cantidades variables de sustancias inhibitoras o estimulantes del crecimiento. Actualmente existen gelificantes inertes como el Agargel®.

Otros agentes gelificantes empleados son la poliacrilamida y la sílica gel. En medio líquido se usa papel filtro, como puente o plataforma, así como la fibra de vidrio; se recomienda añadir carbón activado, ya que en bajas concentraciones ayuda a adsorber diversas sustancias que se forman como desecho en los medios de cultivo (Rodríguez Farfán, 2013).

Complejos naturales

En diversas ocasiones el crecimiento y morfogénesis del tejido vegetal puede ser mejorado mediante pequeñas cantidades de nutrientes orgánicos, entre las cuales se encuentran vitaminas, aminoácidos y diversos suplementos comerciales, que van desde jugos naturales hasta fertilizantes y extractos.

La cantidad de estas sustancias para el cultivo *in vitro* exitoso varía de acuerdo con la capacidad sintética del inóculo.

De acuerdo a Robbins, (1922) y White, (1934), citados por Sharry & Abedini, (2015), el primer cultivo realizado con éxito en el cual fue utilizado un suplemento implicaba el uso de extracto de levadura. Otras adiciones a los medios de cultivo de tejidos vegetales han sido:

- Extractos de carne (malta, levadura y digestión de fibrina).
- Zumos, pulpas y extractos de diversas frutas (Guha & Maheshwari, 1967; Ranga Swamy, 1958; Steward & Shantz, 1956), incluidos los de los plátanos y los jitomates.
- Fluidos que nutren embriones zigóticos inmaduros.
- Extractos de plántulas u hojas de plantas.
- Extracto de papas hervidas y licor de maíz (Fox & Miller, 1959).
- Savia vegetal o el extracto de raíces o rizomas, considerados los principales sitios de síntesis de citocininas.
- Hidrolizados de proteínas (usualmente caseína), contienen una mezcla de todos los aminoácidos presentes en la proteína original.

Agua de coco

Cuando se añade a un medio de cultivo el endospermo líquido de coco promueve la inducción de las células vegetales a dividirse y crecer más rápidamente.

El agua de coco se usó por primera vez en cultivos de tejidos por Van Ovenbeek (1942) quien descubrió que su adición a un medio de cultivo era necesaria para el desarrollo de embriones jóvenes de *Datura stramonium*. Gautheret (1948) encontró que el agua de coco podría ser utilizada para iniciar y mantener el crecimiento en cultivos de tejidos de varias plantas. Caplin y Steward (1948) demostraron que el callo derivado de los inóculos tisulares de las raíces de *Daucus carota* creció más rápidamente cuando el 15% del total del agua de coco era añadido a un medio que contiene AIA (George, Hall, & De Klerk, 2008).

A diferencia de otros complejos, tales como extracto de levadura, extracto de malta e hidrolizado de caseína, el endospermo de coco ha demostrado ser más difícil de reemplazar por medios definidos.

Se ha encontrado que es benéfico para la inducción y el crecimiento de callos en suspensión y para promoción de morfogénesis.

En los medios modernos, donde los compuestos orgánicos a menudo se agregan en cantidades definidas, el principal beneficio del uso de agua de coco es que proporciona entre otras cosas una citoquinina natural altamente activa ya que a menudo tiene el mismo efecto que la adición de una citoquinina sintética reconocida (Ver composición Anexo II).

Jugo de piña

Dentro de la composición nutricional de la piña se encuentran; proteínas, carbohidratos, azúcares solubles como (sacarosa, fructosa, glucosa), vitaminas (A, B1, B2, B3 B5, B6, B7, B9 B12, C, D, E y K), ácidos orgánicos como él (ácido cítrico, ácido málico, trazas de ácido succínico y oxálico), minerales (calcio, hierro, zinc, arsénico, magnesio, sodio, fósforo, trazas de yodo, potasio entre otros), polisacáridos pépticos como la (pepsina, actuando principalmente como fibra dietética), antioxidantes (ácido ascórbico), polifenoles (miricetina, catequina actividad antioxidante). También es importante la presencia de sustancias promotoras de crecimiento (Ver composición Anexo II).

Cultivo de tejidos en orquídeas

Se reporta que las orquídeas fueron las primeras plantas propagadas *in vitro* a partir de la siembra de semillas, de manera simbiótica y asimbiótica, al introducirse la técnica de cultivo *in vitro* para la micropropagación (Correa & Andrade, 2008).

Por su gran importancia hortícola y comercial de las orquídeas, se han desarrollado diversos métodos de propagación, tanto sexual, a través de semillas como asexual con el cultivo de segmentos vegetativos (inóculos) aclimatización.

Desde el comienzo el establecimiento de métodos para la propagación de orquídeas ha abarcado desde la microporpagación *in vitro* hasta la propagación convencional vegetativa, tomando como modelo de estudio el género *Phalaenopsis* por su importancia económica.

Knudson, uno de los precursores en el campo de la propagación a partir del cultivo de yemas de las inflorescencias de *Phalaenopsis* sp, los cuales fueron cultivados en un medio KC (modificado con azúcares) esperando la generación de plantas completas. Después de un periodo de 14 a 60 días se dio la aparición de hojas; las raíces se produjeron después de la formación de dos o tres hojas. Tan solo siete de los 65 brotes inducidos se desarrollaron. Sin embargo, Rotor es considerado el inventor de la micropropagación moderna de orquídeas, fue el primero en publicar un informe científico sobre la multiplicación clonal de una planta superior *in vitro*. Su método involucró un medio de cultivo definido, técnicas asépticas e inóculos. El procedimiento de Rotor no involucró la formación o proliferación de callos. La cantidad de plantas que se pueden producir con el método propuesto por Rotor no es grande, pero tiene un significado práctico.

Cuerpos parecidos a protocormos (PLB's)

Se define como Protocom like body (PLB's) por sus siglas en inglés estructuras que son formadas *in vitro* por los inóculos y/o callo (Yam & Arditti, 2009) en español se les denomina cuerpos parecidos a protocormos. Los primeros en describirlos fueron Curtis y colaborados a finales de la década de 1940, quienes observaron la formación de múltiples puntos de crecimiento (protuberancias) en callo derivado de plántulas, en el estadio de protocormo, de *Cymbidium* y *Vanda*, germinadas asimbióticamente (Curtis y Nichol, 1948 citado en Yam y Arditti, 2009), por lo que los denominaron "Calloide", a partir del cual se formaban plántulas completas. Y desde entonces vislumbraron el potencial de estas estructuras.

El primer registro fotográfico de un PLB lo realizó Hans Thomale en 1957, quien reporta que "piezas de bulbos de *Orquis maculata*, cultivados asépticamente, regeneraron brotes y raíces". George Morel utiliza esta fotografía y la publica en 1960, utilizando por primera vez, en la orquideología, el término "Protocorm like body" (PLB).

En un principio el término solo era aplicado cuando se utilizaban inóculos, no semillas. Con las investigaciones realizadas en los años posteriores el término

PLB, es aplicado a los cuerpos esféricos producidos por los inóculos, no exclusivamente a los derivados de las semillas y sin importar la ruta morfogénica (Arditti, 2008). Actualmente debido al potencial de micropropagación clonal que se obtiene con los PLB's, estas estructuras son consideradas como el logro más exitoso en la micropropagación de orquídeas.

La formación de protocormos a partir de semillas germinadas y la posterior inducción de cuerpos parecidos a protocormos (PLB's) o callos de los inóculos de protocormos, tallo, brotes, hoja, raíz o pseudobulbos se ha convertido en un método confiable para la propagación tanto de orquídeas como de plantas vasculares (Ng & Mohd Saleh, 2011).

Cabe señalar que en la propagación vegetativa intensiva de orquídeas con alto valor comercial (fig. 3), los PLB's son los inóculos de mayor demanda debido a su rápido desarrollo *in vitro*; además de que, con ellos, se tiene la certeza de la semejanza fenotípica con los progenitores (Sagawa, 1991).

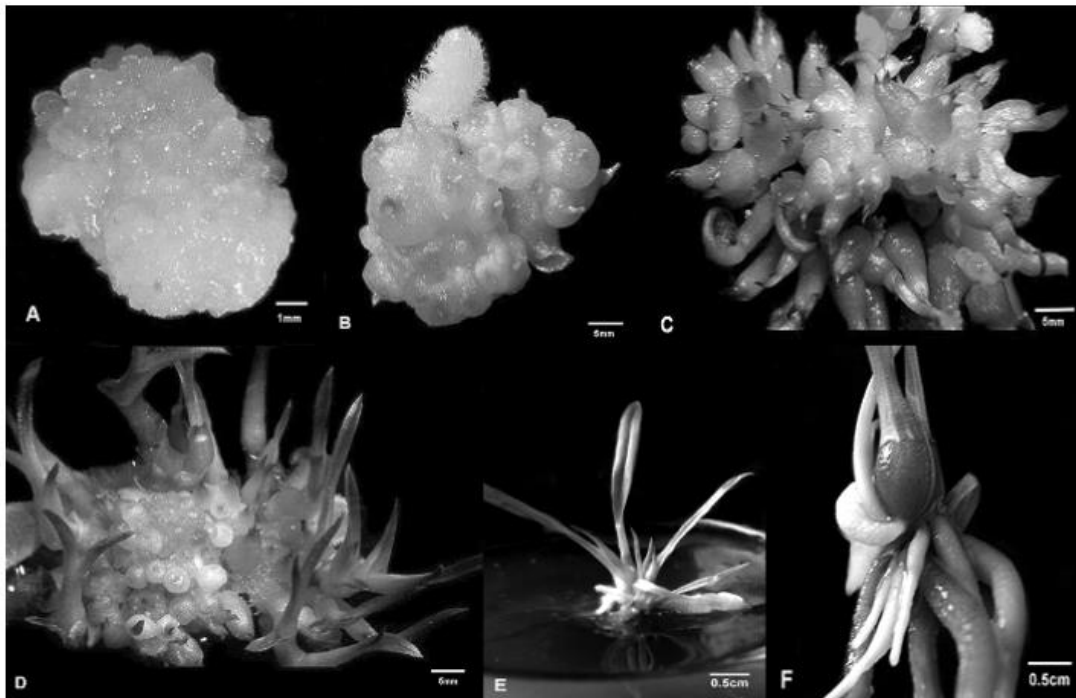


Figura 3. Formación de PLB's y desarrollo de plántulas de *Eucybe mariae* a partir del cultivo *in vitro* de secciones apicales y basales de protocormos en medio MS modificado. A) Desarrollo de nódulos en la superficie del inóculo a los 30 días. B) Formación directa de PLB's a partir del inóculo, a los 65 días. C) Elongación de los PLB's, a los 120 días. D) Desarrollo foliar y radicular, a los 165 días tomado de Suárez-Quijada, Hernández-Altamirano, Chávez-Ávila, Sandoval-Zapotitla, & Martínez-Palacios, 2007.

Antecedentes de medios de cultivo enriquecidos con complejos orgánicos

Si bien es cierto que los primeros medios de cultivo fueron elaborados con complejos orgánicos, no fueron del todo exitosos, ya que no se conocía con seguridad su composición nutricional, la cual depende en gran medida del estado de estos (grado de madurez, zona de colecta, época de producción), lo que ocasionaba que los resultados de las investigaciones no podían repetirse. Estos problemas actualmente se evitan gracias a la industrialización de los alimentos, que utiliza técnicas de producción estandarizadas que permiten eliminar dichas variables.

Salazar (2012) y colaboradores utilizaron como ejemplares de estudio a *Prosthechea vespa* Vell. y *Sobralia klotzscheana* Rchb, usaron medio de cultivo Murashigue & Skoog (1962) (MS) adicionado con agua de coco (AC) o jugo de piña (JP). Obtuvieron que el tratamiento con jugo de piña favoreció en una mejor respuesta en la formación de plántulas con diferencias estadísticas significativas de 22% en *P. vespa* y 43% en *S. klotzscheana*.

Salazar-Mercado, Amaya-Nieto, & Barrientos-Rey (2013), con *Cattleya mendelii*, utilizando cinco medios de cultivos entre ellos MS enriquecido con complejos orgánicos; agua de coco o jugo de piña. Observaron una mayor eficiencia de germinación asimbiótica y desarrollo de plántulas.

Salazar, Amaya, & Barrientos en 2013 propagaron un híbrido de *Phalaenopsis* utilizando como medio de cultivo el MS suplementado con jugo de piña o agua de coco, adicionados con ácido indol acético y ácido giberélico. Obtuvieron como mejor tratamiento, para la germinación y formación de plántulas, el medio con agua de coco o con jugo de piña.

Si bien existen premezclas en el mercado, los laboratorios frecuentemente realizan sus propios medios de cultivo. Esto no solo permite modificar las formulaciones estándares ajustándolo a las necesidades fisiológicas y requerimientos nutricionales de cada cultivo, sino también comprender detalladamente el rol que los diferentes elementos químicos tienen en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Generalmente esta reportado que los complejos orgánicos son utilizados a una concentración del 10% v/v en los medios de cultivo (García, Valerín, & Salazar, 1993; Gonzalez, 2014; Rasmussen et al., 2015).

Después de realizar una búsqueda en diferentes bases de datos especializadas como, Scopus, ScienceDirect, Web of Science, Open Access, Scielo y TESIUNAM, no se encontró información de las especies a estudiar que manejaran la germinación *in vitro* y el uso de complejos orgánicos para las mismas.

Descripción de las especies estudiadas

Laelia autumnalis (Llave & Lex.) Lindl

Planta epífita, con pseudobulbos oblongos, alargados, longitudinalmente arrugados, con 1-3 hojas oblongas, agudas, arqueadas, de hasta 17 cm de largo y 3.8 cm de ancho; la inflorescencia va de 40-70 cm de largo, con un racimo de 5 a 12 flores que abren en sucesión. Las flores son variables en tamaño, de 7 a 10 cm de diámetro, con fuerte fragancia en días con sol; posee sépalos lanceolados y los pétalos oblongo-lanceolados son de color rosa-púrpura o lila; el lóbulo medio del labelo ligeramente enrollado, de color más oscuro, los lóbulos laterales son erectos, blancos y con rayas rojas, bifurcadas en la garganta y en el centro con 3 quillas amarillentas; las flores son vistosas y pueden durar de 10 a 15 días en la planta (Halbinger & Soto, 1997) ver figura 4.

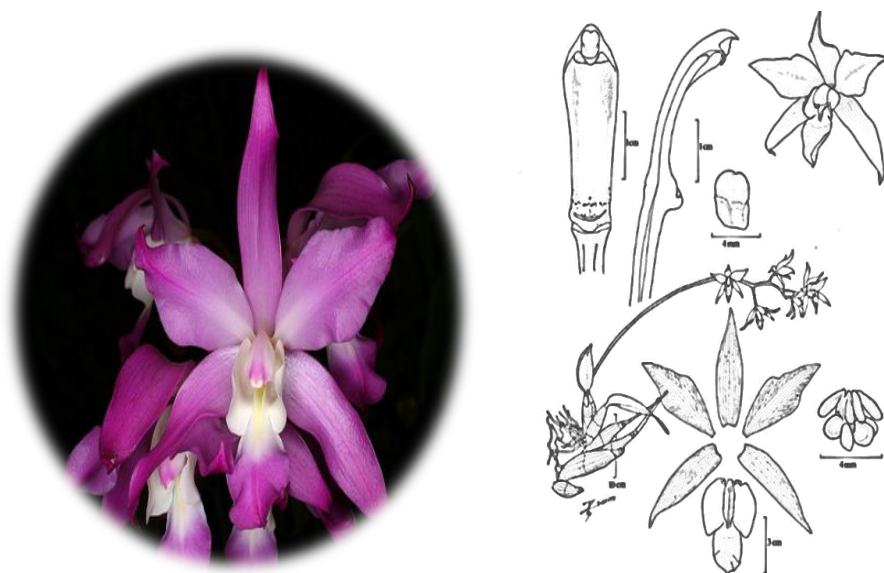


Figura 4. *Laelia autumnalis* (Llave & Lex.) Lindl (Halbinger & Soto, 1997).

DISTRIBUCIÓN

Endémica de México se distribuye en el centro del país, en los estados de Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, México, Morelos, Guerrero y Distrito Federal.

ECOLOGÍA

Crece preferentemente sobre encinos y ocasionalmente sobre rocas en altitudes de 1,800 a 2,700 m, y es exclusivo de bosques de pino-encino, caducifolios, secos o húmedos y frecuentemente abiertos. Florece en otoño principalmente en el mes de noviembre (Halbinger & Soto, 1997).

Govenia superba (La Llave & Lex.) Lindl.

Terrestre, con pseudobulbos globosos envueltos basalmente por brácteas escariosas con 2 hojas elípticas, plegadas apicales, delgadas que son de color rojo. Con una inflorescencia terminal en primavera o en otoño, erecta, roja, de 105 cm de largo, racimosa con brácteas prominentes, que produce muchas flores aromáticas derivadas del centro (fig. 5).

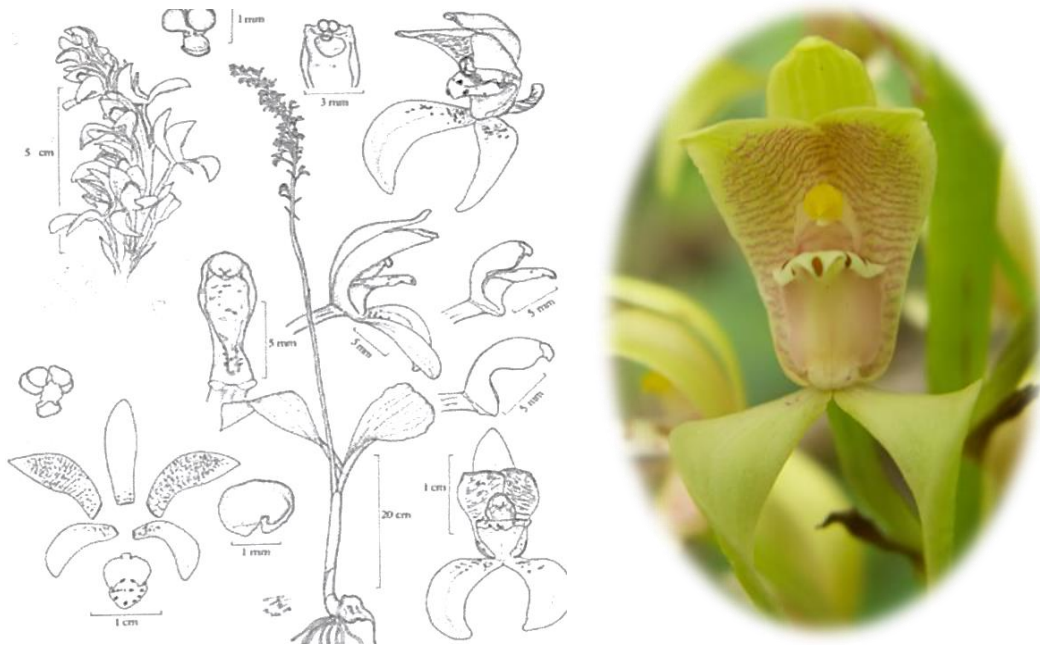


Figura 5. *Govenia superba* (La Llave & Lex.) Lindl. (Espejo-Serna A., García-Cruz J., López-Ferrari A. R., 2002).

DISTRIBUCIÓN

Desde el centro de México, Guatemala, El Salvador, Colombia, Venezuela y Ecuador (Navarro & By-nc-, 2009).

ECOLOGÍA

Crece en bosques de pino – encino en montañas con climas muy húmedos con sombra a altitudes de 2000 a 3000 m.s.n.m. Florece en los meses de junio y julio (Navarro & By-nc-, 2009).

***Prosthechea cochleata* (L.) W. E. Higgins**

Planta epífita con pseudobulbos lisos en forma oblonga-discoide. Cada pseudobulbo lleva de una a tres hojas lineales no suculentas, que crecen desde la base. Las flores con su oscuro capucha-como el labio y más pálido colgando de sépalos y pétalos, son soportados en racimos de crecimiento continuo. Las flores son inusuales en que se celebran la otra manera en comparación con la mayoría de las orquídeas. En lugar de resupinarse (retorcido para que el labio se lleva boca abajo) el labio se mantiene en la parte superior de la flor (no resupinate). Esta especie comienza a florecer en la primavera y puede continuar hasta seis meses (fig. 6).



Figura 6. *Prosthechea cochleata* (L.) W. E. Higgins tomado de <https://fitotecz.blogspot.mx/p/blog-page.html>

ECOLOGÍA

Crece en árboles de bosques húmedos y pantanos. En selva tropical esta especie se encuentra a entre 2 y 20 m de alto en los troncos verticales de árboles grandes. Entre 1500 y 2000 m.s.n.m.

DISTRIBUCIÓN

Belice, Colombia, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Las Antillas, Nicaragua, Panamá, Venezuela y México (Campeche, Chiapas, Hidalgo, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán) (Hágsater, E., Soto-Arenas, Salazar Chávez, Jiménez Macorro, M. A. López Rosas, & Dressler, 2005).

***Bletia neglecta* Sosa**

Planta terrestre de hasta de 36 a 76 cm de alto. Cormos horizontales piriformes, de 1 a 3 cm de largo y de 1.5 a 3.5 cm de ancho. Presenta de una a tres hojas plegadas, verdes, lineares a lanceoladas, generalmente ausentes en la época de floración, de 21 a 50 cm de largo y de 0.6 a 1.4 cm de ancho. Inflorescencia escaposa, de 32 a 71 cm de largo. Flores de 2 a 6, por inflorescencia, de 3 a 3.5 cm de diámetro, rosadas con blanco y con las venas conspicuas. El labelo trilobado, recurvado y con cinco a siete quillas longitudinales (Luna Rosales, 2016) (fig. 7.).

ECOLOGÍA

Habita en bosques de encino, pino-encino, bosques de abeto y matorrales xerófitos, desde los 1 750 a 2 740 m de altitud. Florece de octubre a enero.

DISTRIBUCIÓN

Endémica de México. Se distribuye en el centro y sur del país, en los estados de México, Morelos, Distrito Federal, Michoacán y Veracruz.



Figura 7. *Bletia neglecta*, tomado de Espejo-Serna A., García-Cruz J., López-Ferrari A. R., 2002.

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad el rescate y conservación de las especies de orquídeas mexicanas es una labor importante debido a la pérdida acelerada de su hábitat a causa de la actividad humana y a la extracción ilegal de ejemplares para su comercialización. Por lo que es de suma importancia el entendimiento de la biología de cada especie para optimizar los métodos de propagación y preservarlas.

Existen una amplia variedad en el mercado de medios de cultivo idóneos para la propagación *in vitro* de orquídeas, sin embargo, muchos de ellos tienen elevado costo. El uso de medios de cultivo alternativos que sustituyan las sales minerales y demás reguladores de crecimiento resultan ser una buena opción, ya que además de disminuir costos y disponibilidad en el mercado. Se sabe que las sustancias de origen orgánico potencializan el desarrollo en las plántulas sin afectar su calidad, por lo que es necesario investigar sus efectos.

HIPÓTESIS

Los medios de cultivo enriquecidos con complejos orgánicos tendrán la misma respuesta en la germinación *in vitro* de diferentes especies de orquídea que los medios convencionales, por lo que se obtendrá un medio de cultivo que no solo disminuirá los costos, sino que tendrá la misma eficiencia que los ya establecidos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Establecer el protocolo de germinación *in vitro* para cuatro especies de orquídeas: *Laelia autumnalis*, *Govenia superba*, *Prosthechea cochleata* y *Bletia neglecta*.

Objetivos particulares

- Determinar el medio de cultivo apropiado para la germinación *in vitro* de semillas de *cada especie*.
- Promover con complejos orgánicos económicos la germinación *in vitro*.
- Comparar el porcentaje de germinación en diferentes medios de cultivo para cada especie.
- Identificar y establecer los estadios durante la germinación de las cuatro especies

MATERIAL Y MÉTODO

Material biológico

Se utilizaron semillas de *Laelia autumnalis*, *Prosthechea cochleata*, *Govenia superba* y *Bletia neglecta*, obtenidas del banco de semillas de la Unidad de Investigación en Biología Vegetal de la FES Zaragoza, recolectadas en el Parque Nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl (Izta-Popo), ver cuadro 1.

Cuadro 1. Semillas de orquídeas para la germinación *in vitro*.

<i>Especie</i>	<i>Fecha de colecta</i>	<i>Lugar de colecta</i>
<i>Laelia autumnalis</i>	12/09/2011	Parque Nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl
<i>Prosthechea cochleata</i>	27/07/2009	
<i>Govenia superba</i>	17/12/2006	
<i>Bletia neglecta</i>	6/02/2003	

Evaluación de viabilidad

La viabilidad de las semillas se determinó por medio del método bioquímico de cloruro 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC), tomando una muestra representativa de semillas por especie, colocándolas en sobres de papel filtro (2x2 cm), los cuales fueron sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio al 10% de cloro (v/v), adicionado con una gota de jabón líquido, durante 10 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, fueron enjuagados con agua destilada estéril y colocados en una solución de TTC al 1% durante 72 horas en oscuridad a una temperatura de 23° C ± 2° C (Padrón Hernández, 2006; Rodríguez Farfán, 2013).

Posteriormente fueron retirados de la solución de TTC y lavados con agua destilada estéril. Las semillas se observaron con el estereoscopio, tomando 50 semillas al azar, considerando las teñidas de color rojo intenso a anaranjado como viables.

Medios de cultivo

Los complejos orgánicos adicionados a diferentes concentraciones de sales basales fueron la principal variación en la composición de los medios de cultivos utilizados para la germinación *in vitro*. Se utilizaron siete medios nutritivos (siete tratamientos) cada uno con sales basales Murashige & Skoog (MS) o de Kao & Michailuck (KM) o del fertilizante comercial Peter's® en diferentes concentraciones, adicionados con jugo de piña y agua de coco al 10% v/v (Cuadro 2) los cuales fueron esterilizados en autoclave durante 15 minutos a 120 °C, a una presión de 20 lb/pulg.

Obteniendo un total de 5 repeticiones por tratamiento para cada especie evaluada.

Cuadro 2. Composición de los medios de cultivo utilizados como tratamientos para la germinación *in vitro* por especie.

	MS		KM		PETERS®		
CONCENTRACIÓN	12%	50%	12%	50%	12%	50%	100%
SUPLEMENTOS ORGÁNICOS	Agua de coco y Jugo de piña 10% v/v						-
PIRIDOXINA	0.1 mg/L						0.5 mg/L
TIAMINA	0.4 mg/L						0.5 mg/L
NIACINA	0.5 mg/L						-
MYOINOSITOL	100 mg/L						-
AZÚCAR REFINADA	30 gr/L						30 g/L
CARBÓN ACTIVADO	2 g/L						-
AGARGEL	6 g/L						6 g/L
pH	5.7						5.7

Desinfestación y siembra *in vitro*

En sobres de papel filtro circular de 4 cm de diámetro sujetos con un clip metálico, se colocó una muestra de aproximadamente 100 semillas que fueron sumergidas en agua destilada para extraer el aire.

Posteriormente permanecieron en una solución de etanol a 70% v/v durante 5 minutos, transcurrido el tiempo, fueron transferidas a una solución de NaOCl al 10% (v/v) por 10 minutos, en agitación constante; este procedimiento se llevó a cabo en condiciones asépticas (dentro de la campana de flujo laminar) (Romero-Tirado, Luna, & Barba, 2007) realizando tres enjuagues con agua destilada estéril.

Con de pinzas de disección, fueron colocados en una caja Petri retirando el clip y extendiendo cada sobre en el medio de cultivo.

Los cultivos permanecieron en el cuarto de incubación con una intensidad luminosa de 4670 lux, a una temperatura de 25° C +/- 2° y fotoperiodo de 16/8 (Muñoz Barrionuevo, 2011).

Evaluación de la germinación.

Para evaluar el porcentaje germinación y las etapas de desarrollo durante la germinación se llevó a cabo un registro en cada una de las repeticiones por tratamiento de las distintas especies, cada siete días durante un periodo de 134 días. Considerando los estadios propuestos y descritos por Batygina, Bragina, & Vasilyeva en 2003 propusieron nueve estadios para la evaluación (fig. 8).

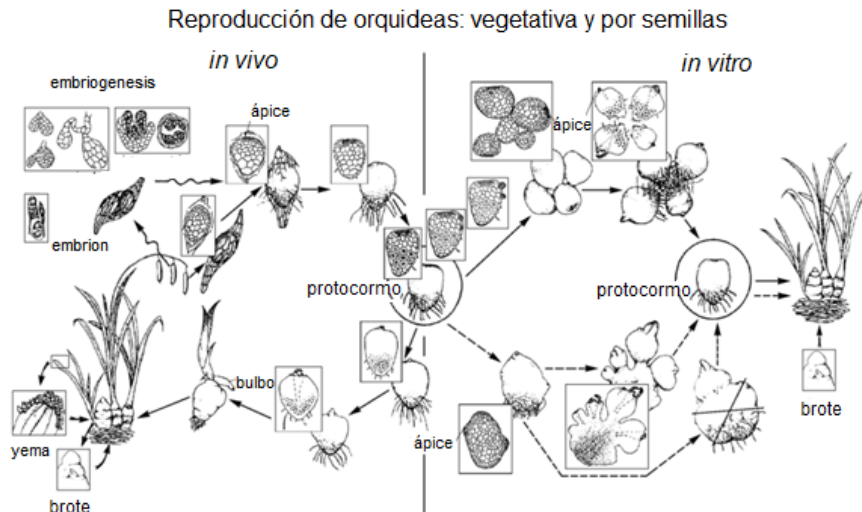


Figura 8. Estadios ontogénicos propuestos por Batygina y colaboradores. Tomado de Batygina, Bragina, & Vasilyeva, 2003.

Evaluación del índice de desarrollo.

Los cambios ontogénicos del embrión de las semillas para cada especie durante el proceso germinativo fueron registrados en cada una de las repeticiones por tratamiento, cada siete días durante 134 días, para establecer los cambios ontogénicos del embrión; con el propósito de determinar el índice de desarrollo (ID.) El índice de desarrollo refleja el estadio ontogénico de los embriones durante el proceso de germinación de las semillas, se calcula con la sumatoria de los porcentajes obtenidos a partir del número de individuos registrados en cada estadio ontogénico (e_x) entre el total de individuos en la muestra e y multiplicándolo por el valor del estadio ontogénico (x):

$$ID = \sum_{x=1}^{x=8} (e_x/e) (x) (100)$$

Dónde:

X= Valor del estudio ontogénico e_x =Número de individuos registrados
 e =Total de individuos de la muestra
 (Rodríguez Farfán, 2013)

Diseño estadístico.

Los datos obtenidos, tanto del índice de desarrollo como del porcentaje de germinación, fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA) de dos factores para determinar el medio de cultivo más adecuado para inducir la germinación de semillas *in vitro* de cada especie, así como para comparar el desarrollo en los diferentes estadios ontogénicos durante la germinación con el programa estadístico STATGRAPHICS Centurión XVI.I.

Análisis anatómico y cortes histológicos.

Durante la germinación se lograron observar estructuras anexas a los protocormos. Por tanto, se realizó la identificación histológica y morfológica, mediante un análisis con las técnicas de microscopía de luz sugeridas por Sandoval (2005):

Fijación: Para provocar la muerte de los tejidos, impidiendo la división celular y conservar su morfología sin sufrir alteraciones químicas, el material biológico fue fijado en una solución de FAA (formaldehído-ácido acético glacial-agua) al 50% durante al menos 24 horas (Cuadro 3). Uno de los beneficios del este fijador es que tiene una acción endurecedora, por lo que la mayor parte del material puede ser conservado por un largo periodo de tiempo.

Cuadro 3. Preparación de 100 ml de FAA al 100%.

Etanol 96%	50 ml
Ácido acético glacial	5 mL
Formaldehído (37-40 %)	10 mL
Agua	35 mL

- Deshidratación: este proceso se lleva a cabo para retirar el exceso de agua contenida dentro de los materiales vegetales previamente fijados y endurecidos, lo cual permite que los materiales se vuelvan firmes.

Como los tejidos eran de un tamaño entre 2 a 3 mm², se colocaron en sobres de papel filtro, posteriormente fueron envueltos en una gasa, para evitar la pérdida de material, y lavados con agua corriente durante 2 h por cada 24 h que permanecieron en la solución fijadora. El proceso de deshidratación consistió en una serie de concentraciones graduales de alcohol etílico (30, 50, 70, 95, 100%) en las cuales fueron introducidas los tejidos durante una hora respectivamente.

- Inclusión en parafina: para facilitar el corte de los tejidos, proporcionarles sostén y soporte interno, fueron incluidos en parafina histológica, utilizando el método de inclusión/infiltración indirecta (Sandoval, 2005). Los tejidos

deshidratados fueron trasferidos a diferentes concentraciones de parafina con xilol como se muestra en el cuadro 4, durante dos horas en cada mezcla. Posteriormente a una mezcla de xilol-parafina en los siguientes tiempos y proporciones (Cuadro 5):

Cuadro 4. Proporción de mezcla etanol absoluto-xilol, para inclusión en parafina.

<i>Etanol absoluto</i>	<i>Xilol</i>
<i>1</i>	<i>1</i>
<i>0</i>	<i>1</i>

Cuadro 5. Preparación de 100 mL de solución para inclusión de parafina

<i>Proporción (mL)</i>		<i>Tiempo (h)</i>
<i>Xilol</i>	<i>Parafina</i>	
<i>8</i>	<i>2</i>	<i>12</i>
<i>5</i>	<i>5</i>	
<i>2</i>	<i>8</i>	
<i>0</i>	<i>10</i>	<i>24</i>

Las mezclas permanecieron en la estufa a una temperatura entre 58-60°. La parafina debe penetrar dentro de todas las células, esto se logra trabajando a una temperatura ligeramente más alta a la de su punto de fusión (Sandoval, 2005).

Después de sumergir los tejidos en parafina pura, estos se colocaron en parafina fundida en moldes circulares de 10 mm de radio x 6 mm de profundidad; identificando la orientación, especie y estadio en el cual se encontraban, para de esta manera identificar el tipo de corte que se realizaría (una vez solidificados, los moldes se pueden conservar durante tiempo indefinido) (Romero, 1990).

- Cortes al micrótopo: los cortes histológicos se llevaron a cabo con un micrótopo de deslizamiento. El bloque de parafina con el tejido contenido fue fijado a la platina con ayuda de calor y se ajustó al micrótopo dependiendo el grosor deseado (entre 10 y 15 micras)

Conforme se fueron realizando los cortes, fueron recogidos en un cristizador con agua a una temperatura entre 38-45°, a la que previamente se le espolvoreo grenetina en polvo para cubrir la superficie, facilitando que los cortes quedaran adheridos a los portaobjetos. Se dejaron secar antes de la desparafinación.

- Desparafinación: para teñir las muestras es necesario retirar la parafina sobrante, para ello se lavaron con xilol al 100% durante 20 minutos. Para

eliminar el xilol de los tejidos se lavó con una solución de etanol-xilol 1:1 (v/v) por 5 minutos y con etanol absoluto por 5 minutos (Romero, 1990).

- Tinción: para teñir los tejidos se utilizaron cuatro colorantes: safranina “O”, verde rápido FCF, azul negro de naftol y yoduro de potasio (lugol) para identificar estructuras y contenidos celulares específicos.

Los colorantes más utilizados en botánica son safranina “O” y verde rápido FCF en combinación, la safranina tiñe de rojo cutícula, paredes lignificadas, nucléolos, y taninos condensados; mientras que el verde rápido proporciona un color verde azulado a las paredes celulósicas y de un tono verde violáceo al citoplasma.

Por su parte el azul negro de naftol es recomendado para la detección de proteínas tiñéndolas de azul intenso, ya que en muchas semillas el embrión, el endospermo y el perispermo contiene como principal sustancia de reserva estas biomoléculas, así como las plántulas en sus primeras etapas de desarrollo.

El yoduro de potasio (lugol) tiñe específicamente el almidón en azul violeta, que abunda en órganos de almacenamiento, es el polímero de reserva más común en la mayoría de las plantas (Sandoval, 2005).

A continuación, se muestran los pasos que se aplicaron para cada una de las tinciones:

- Rehidratación: para los colorantes acuosos (safranina, lugol y azul negro de naftol) se realizó una rehidratación de los tejidos para que estos penetraran de manera adecuada; con etanol en la siguiente serie: 70, 50 y 30% durante 5 minutos, posteriormente se lavó con agua destilada por 5 minutos.

Para la safranina se tiñeron por 45 minutos; como se mencionó, esta tinción se hace en combinación con el verde rápido.

Pasados los 45 minutos de la tinción de la safranina se enjuago el exceso de colorante con agua destilada durante un minuto, para seguir con la deshidratación, para que el verde rápido pueda penetrar en las células en la siguiente serie: 30, 50, 70, 95, 100 % de etanol durante 3 minutos en cada solución.

Las muestras que tiñeron en verde rápido por 5 minutos se lavaron para eliminar el exceso de colorante en etanol al 100 % por 1 minuto y finalmente en una solución de aceite de clavo por 10 minutos.

Para realizar las tinciones con azul negro de naftol y lugol, las muestras fueron rehidratadas y teñidas por 10 y 5 minutos respectivamente.

Para tener un mejor análisis morfológico las muestras fijadas en FAA al 50%, fueron fotografiadas con un microscopio electrónico de barrido, marca Benchtop modelo 600 JEOL, en el Instituto de Investigaciones en Materiales.

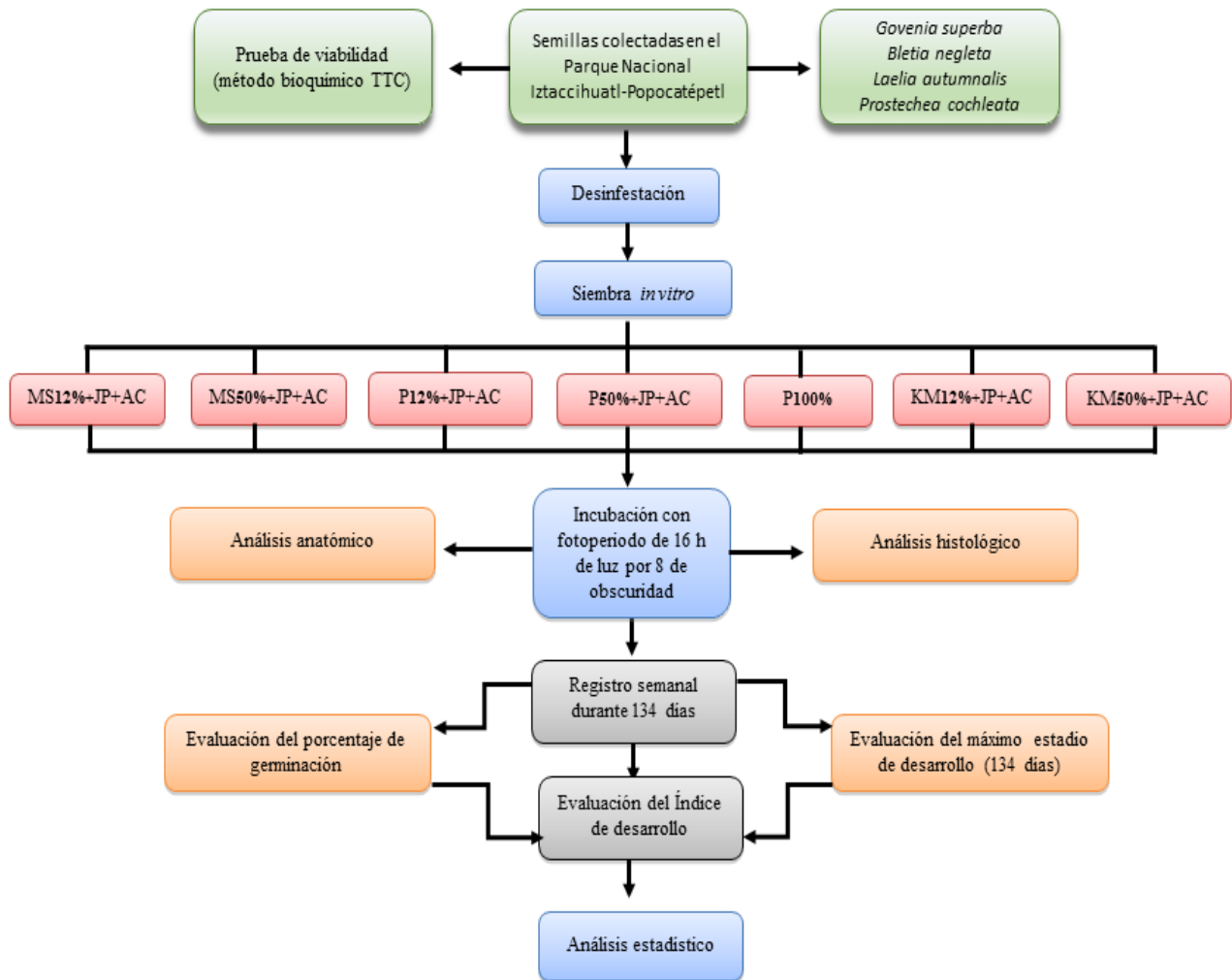


Figura 9. Metodología general.

Resultados y análisis de resultados

Viabilidad

Las semillas utilizadas habían sido almacenadas por periodos de 5 a 13 años (cuadro 5), por lo que se esperaba que la viabilidad fuera baja. Para muchas especies de orquídeas, el almacenamiento por periodos mayores a dos años disminuye la viabilidad e incluso existen semillas que pierden su viabilidad días después de la dehiscencia (Ortega-Larrocea et al., 2007).

La evaluación de la viabilidad demostró la actividad de enzimas deshidrogenasas (enzimas de la respiración) al teñir con la solución de TTC las semillas en las que el embrión presenta algún proceso metabólico (fig. 10), resultando la liberación de iones de hidrógeno, lo que produce una reacción química en la que el tetrazolio (incolore) se reduce a formazán (rojo), tiñendo a las células vivas, en tanto que las muertas permanecen sin colorear (Ruiz, 2009; Victoria T., Bonilla C., & Sánchez O., 2006).

La viabilidad de las semillas se determinó en función del patrón de tinción del embrión y la intensidad de la coloración. Las semillas de todas las especies demostraron tener una viabilidad mayor del 70%.

Cuadro 6. Porcentaje de germinación de las especies estudiadas, de acuerdo con la prueba de TTC.

Especie	Porcentaje de viabilidad	Tiempo de almacenamiento (años)
<i>L. autumnalis</i>	98%	5
<i>B. neglecta</i>	95%	13
<i>G. superba</i>	74%	8
<i>P. cochleata</i>	94%	7

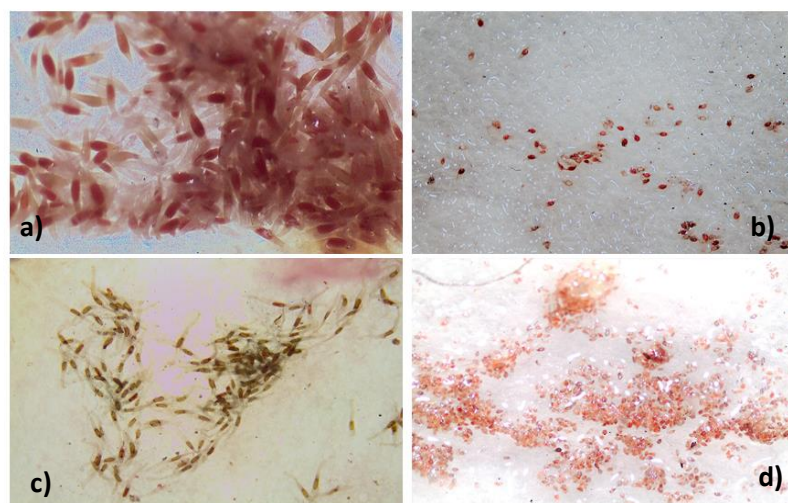


Figura 10. Prueba de viabilidad con TTC. a) *L. autumnalis*. b) *G. superba*. c) *P. cochleata*. d) *B. neglecta*

Porcentaje de germinación

Al analizar los datos obtenidos para el porcentaje de germinación, al no presentar una distribución normal no fue posible realizar un análisis de varianza, por lo que se hizo una comparación entre el tiempo y los tratamientos empleados por especie con el programa de análisis de datos Excel.

Laelia autumnalis

El porcentaje de germinación para las semillas de *L. autumnalis*, independientemente del tratamiento comenzó a los 30 días de cultivo (fig. 11), el tratamiento que mostro el porcentaje de geminación más alto (100%) fue el tratamiento PETERS_{50%}; mientras que el porcentaje menor se registró en el KM_{50%} con un valor de 66.25%.

A los 44 días de cultivo el porcentaje de germinación se encontraba entre el 100 y 90% en la mayoría de los tratamientos, excepto en el tratamiento PETERS_{100%} con un porcentaje de 75%; sin embargo, para el día 134 la germinación de las semillas fue por arriba del 95% en todos los tratamientos (fig. 11).

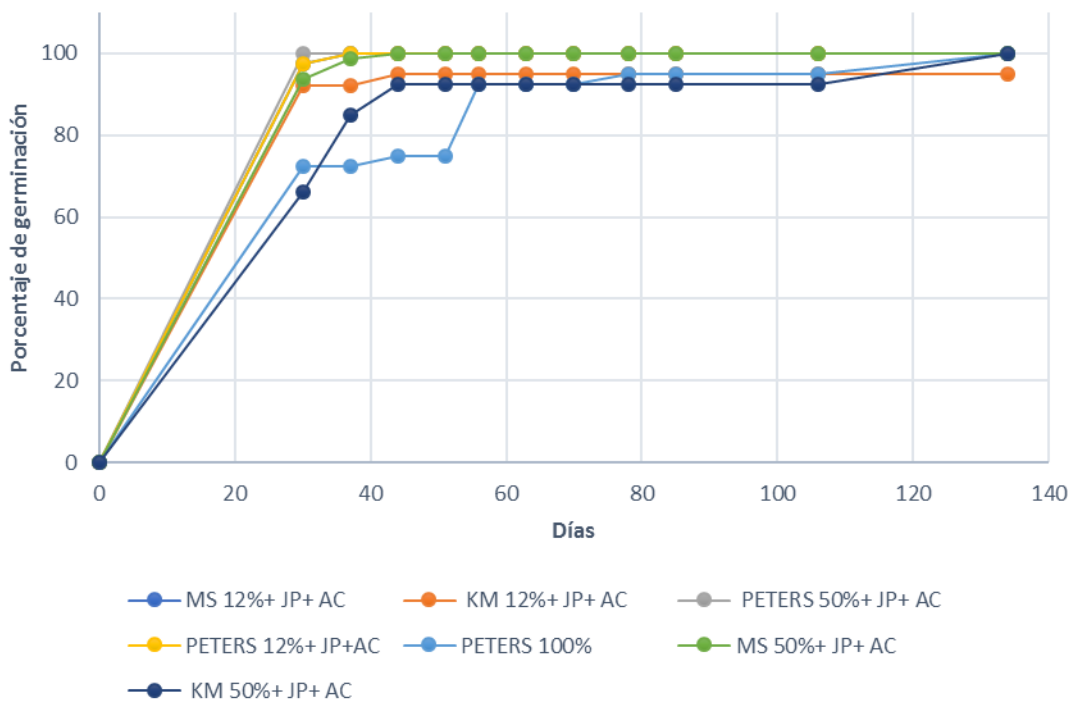


Figura 11. Porcentaje de germinación *L. autumnalis*.

Bletia neglecta

El porcentaje de germinación para las semillas de *B. neglecta* en todos los tratamientos se registró, a partir de los 30 días de cultivo (fig. 12). El porcentaje de germinación menor para esta especie fue de 5% en el tratamiento PETERS_{12%}; mientras que, para el resto de los tratamientos se encontraban entre el 77 y 97%, este porcentaje se registró para el tratamiento PETERS_{100%}.

En el día 37 se observa un incremento considerable en la germinación, en el tratamiento PETERS_{12%} que alcanza el 100%, mientras que el tratamiento que registra el menor porcentaje es el MS_{50%} con un 77%.

A partir de los 51 días de cultivo, el porcentaje de germinación en todos los tratamientos alcanzo el 100% de germinación, porcentaje que se mantuvo hasta el final del tiempo registrado (134 días).

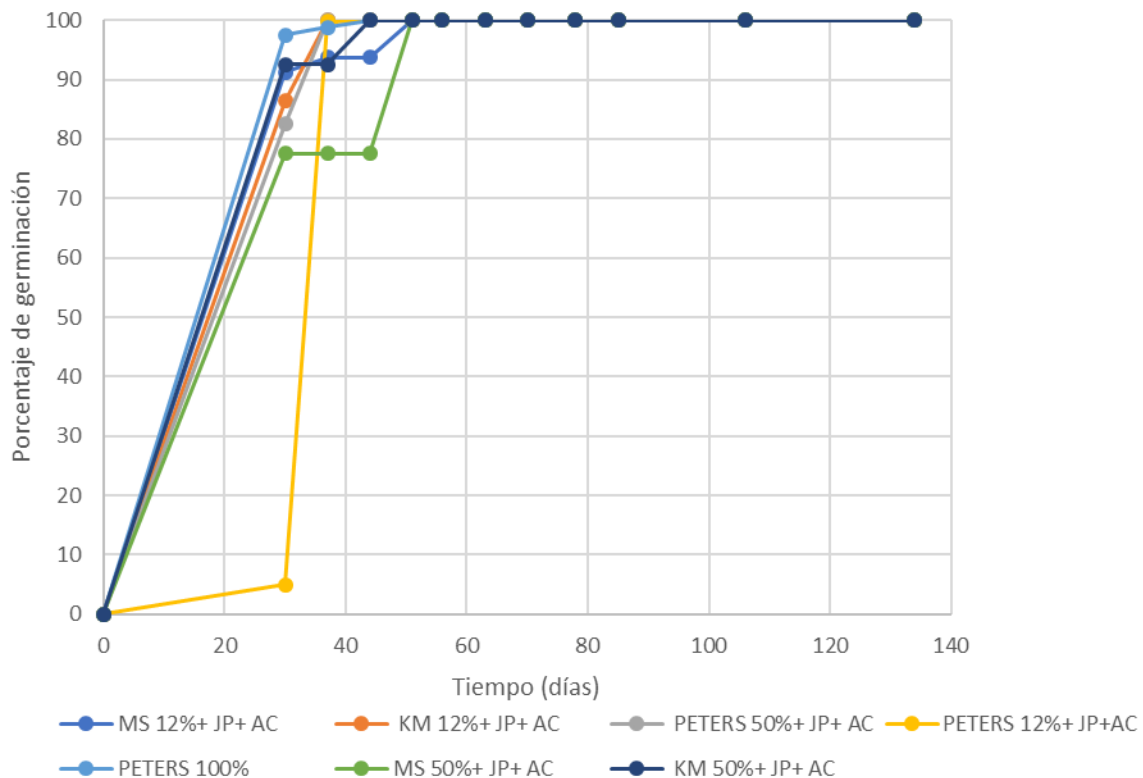


Figura 12. Porcentaje de germinación *Bletia neglecta*.

Prosthechea cochleata

La germinación de las semillas para *P. cochleata* se presentó a los 30 días de cultivo en el tratamiento KM_{12%} (66%) y KM_{50%} (30%); sin embargo, en el día 37 se observa un incremento considerable en el porcentaje de germinación en todos los tratamientos. El porcentaje de germinación más bajo con un valor de 40% fue en el tratamiento KM_{50%}, mientras que el resto de los tratamientos se mantienen en un rango de por arriba del 70% hasta el 87% (KM_{12%}).

Para el día 44 de cultivo, el porcentaje de germinación se registraron por arriba del 90% hasta alcanzar el porcentaje máximo (100%) en la mayoría de los tratamientos, excepto en los tratamientos PETERS_{12%} (79%) y PETERS_{50%} (86%), estos tratamientos alcanzan el máximo de germinación a partir del día 51 y 78 respectivamente (fig. 13).

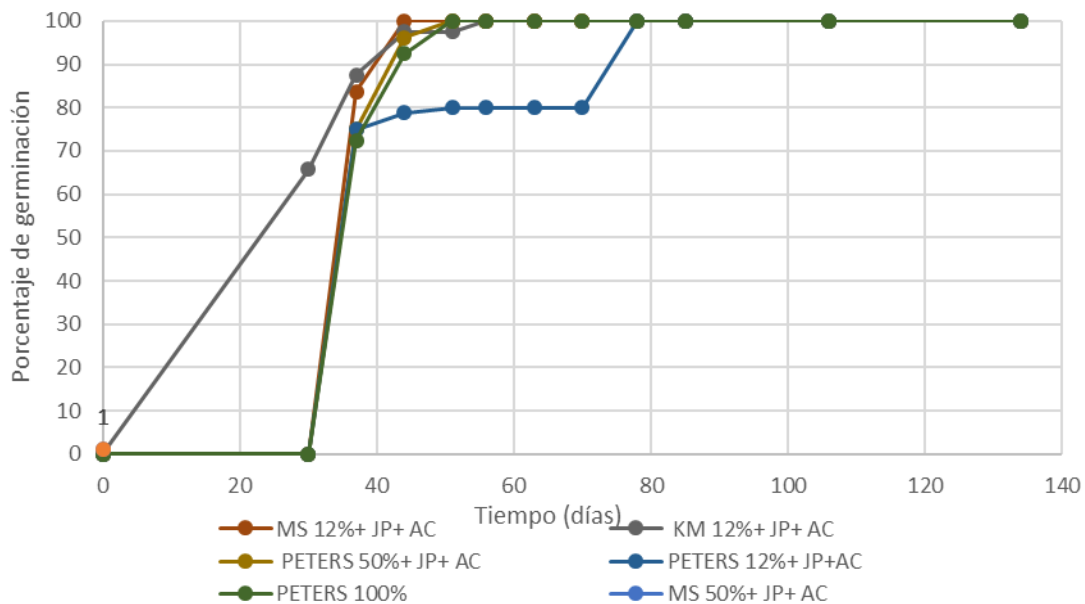


Figura 13. Porcentaje de germinación de *P. cochleata*.

Govenia superba

Las semillas de *G. superba* respondieron a los tratamientos empleados para la germinación, a partir de los 30 días de cultivo (fig. 14), con una germinación de 10% en su mayoría. El tratamiento que presentó un porcentaje de germinación más alto en esta primera observación, fue el PETERS_{100%} con un valor de 40%, seguido por el tratamiento KM_{12%} con un porcentaje de germinación de 30%.

Para los 44 días de cultivo se observa un incremento en la germinación en los medios MS_{50%}, PETERS_{12%} y PETERS_{50%}, que va desde un 35 al 50%, a su vez el tratamiento KM_{12%} alcanza una germinación de 80%; sin embargo, el tratamiento KM_{50%} se encuentra en rezago permaneciendo con una germinación del 10%.

El tratamiento KM_{12%} alcanza la mayor germinación para esta especie, a partir de los 63 días, con un porcentaje de germinación de 87%, seguido por el tratamiento MS_{12%} con un 77% de germinación a partir del día 85.

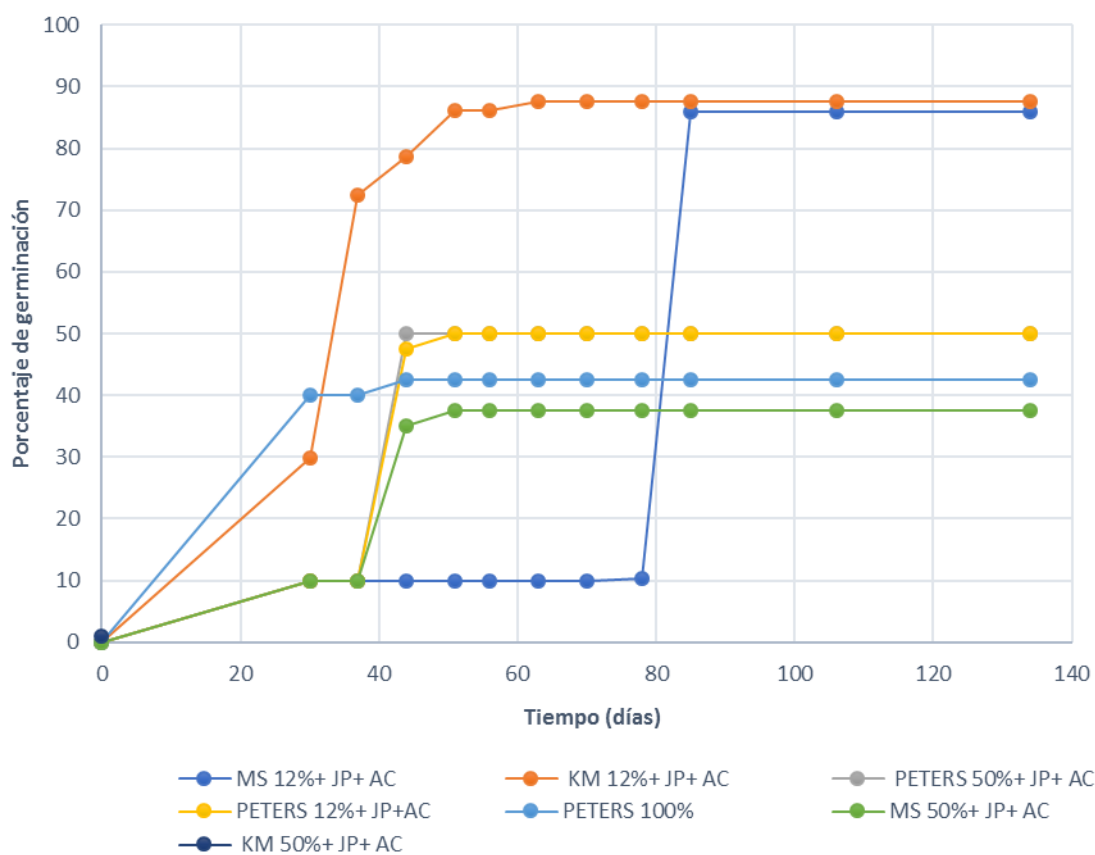


Figura 14. Porcentaje de germinación *G. superba*.

Índice de desarrollo

De acuerdo con los cambios morfológicos observados durante el tiempo de desarrollo, se propusieron los siguientes estadios ontogénicos para las especies estudiadas (fig. 15), con el fin de registrar el desarrollo durante el proceso germinativo:



Figura 15. Estadios de desarrollo propuestos para evaluar la germinación *in vitro*

Los datos obtenidos para el índice de desarrollo para todas las especies estudiadas presentaron una distribución normal (anexo III) por lo que se aplicó un análisis de varianza de dos factores con los siguientes resultados:

Laelia autumnalis

Con base al análisis de varianza (ANDEVA) muestra (Anexo IV) que el índice de desarrollo (ID) para *L. autumnalis* presentó diferencias estadísticamente significativas en cuanto al tiempo ($P= 0.0000$) y los tratamientos ($P= 0.0000$) utilizados para inducir la germinación *in vitro*.

Las comparaciones múltiples de los valores de las medias ID a lo largo del tiempo, independientemente de los tratamientos, muestran (fig. 16) que para el periodo de tiempo que va desde los 30 a los 44 días se registró el menor ID para esta especie, con un valor promedio de 194, el 50% de los embriones se

encontraban en el estadio 1 (semilla hinchada y verde), por lo que el 50% restante continuo su desarrollo al estadio 2 (protocormo), dicho periodo de tiempo resulta igual estadísticamente entre sí, pero diferente y menor al resto de los tiempos analizados.

Los valores del índice de desarrollo para los días 56 y 63 de cultivo no mostraron diferencia estadística entre sus interacciones, sin embargo, si con el resto de los datos analizados. Registrando como estadio de desarrollo representativo protocormo con rizoides (estadio 4) representado en un 80%.

Mientras que a los 70, 78 y 85 días, el índice de desarrollo es estadísticamente igual entre sí, pero diferentes al resto de los tiempos analizados, registrando al 80% de los protocormos en el estadio de protocormo con una hoja (estadio 5).

Para el día 106 el ID promedio es de 602 por lo que muestra una diferencia estadística, lo que indica que la mayoría de los protocormos se encontraba en el estadio 6 (protocormo con dos hojas), mientras que el 2% seguían su desarrollo ontogénico al siguiente estadio (protocormo con tres hojas).

Finalmente, en el día 134 se alcanzó el mayor ID fue de 680, el 80% de los protocormos se encontraban en el estadio 7 (protocormo con tres hojas), solo el 20% permanecía en el estadio de protocormo con dos hojas (estadio 6); resultando ser mayor y diferente al resto los tiempos.

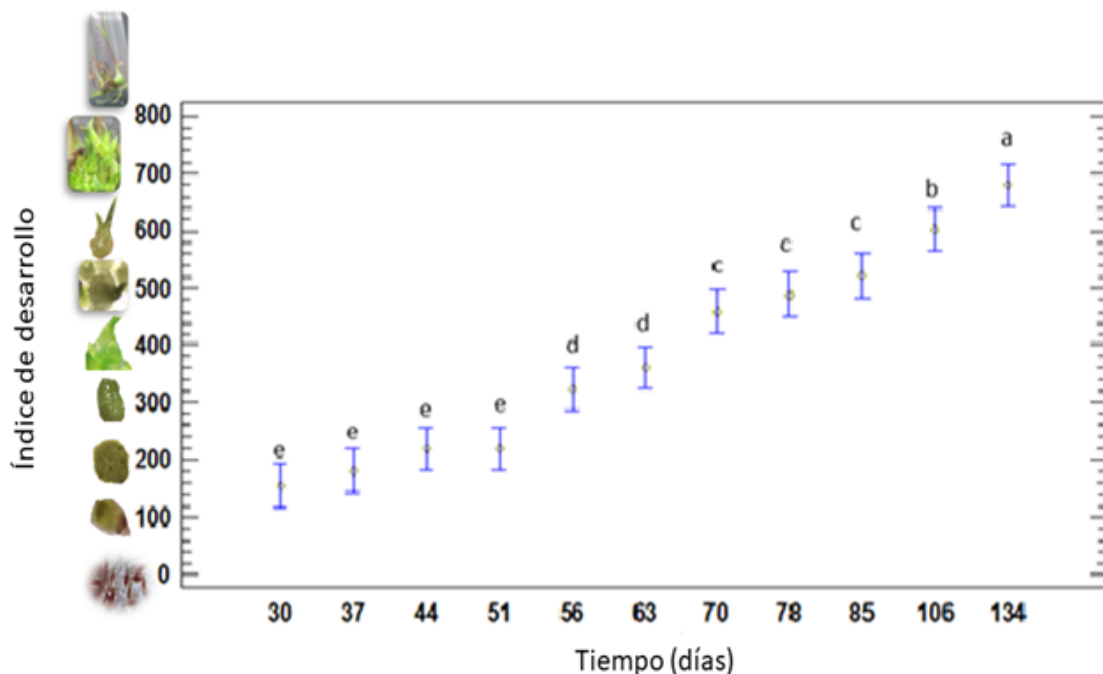


Figura 16. Gráfica de medias e intervalos al 95% LSD. Índice de desarrollo de *L. autumnalis* considerando el tiempo del cultivo, independientemente de los tratamientos empleados.

Al comparar los valores del I.D. para *L. autumnalis* entre los tratamientos, independientemente del tiempo de cultivo; muestra que, el mayor desarrollo (estadio 5) se observó en los tratamientos KM_{50%}, MS_{12%}, MS_{50%} y PETERS_{12%} con un promedio de 470 para el ID, que aunque no muestran diferencia estadística entre sí, sí con el resto de los tratamientos empleados (fig. 17). Por lo que se considera en base al mismo análisis, que los tratamientos PETERS_{100%} y KM_{50%} son aquellos que se encuentran en el estadio intermedio (con un valor de 227 y 309 respectivamente) por lo que el 70% de los protocormos en el caso del tratamiento PETERS_{100%} se encontraban en el estadio 2 y el 30% continuaba al estadio 3, mientras que el 91% de los protocormos en el tratamiento KM_{50%} permanecía en el estadio 3 el 9% continuaba su desarrollo al estadio 4.

El ID menor se observó en el tratamiento KM_{12%} al ser estadísticamente diferente a los tratamientos empleados con un valor medio de 210 lo que indica que la mayoría de los embriones se encontraban en la etapa de protocormo y que solamente el 10% de ellos entraban en el estadio de protocormo con promordio foliar (estadio 3).

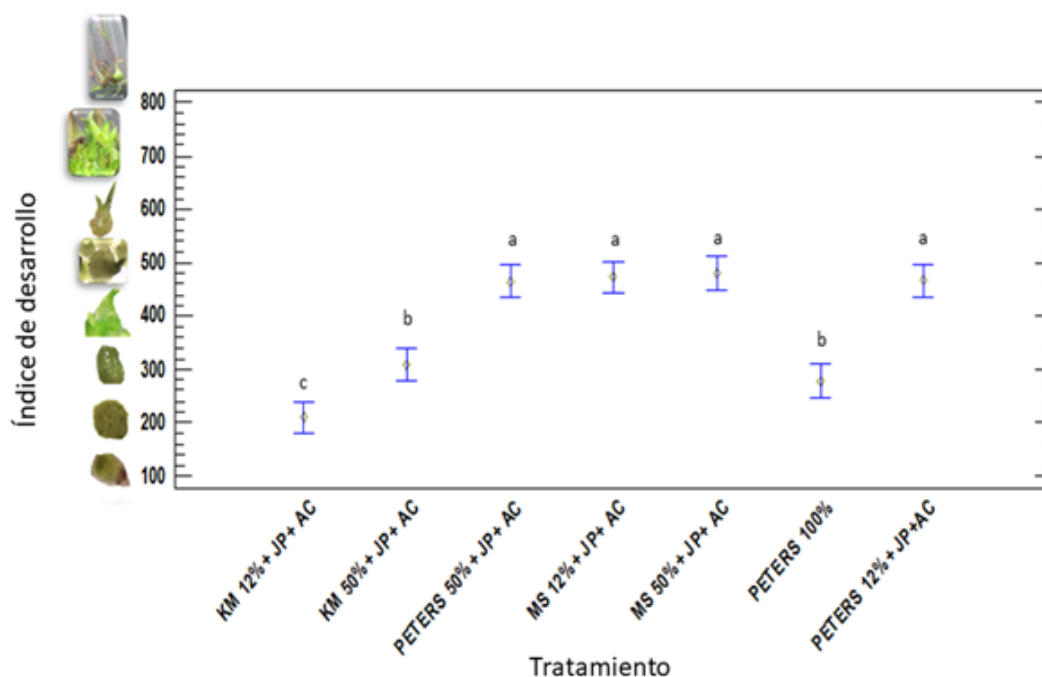


Figura 17. Gráfica de medias e intervalos al 95% LSD. Índice de desarrollo de *L. autumnalis* en tratamientos alternativos independientemente a los días de cultivo.

El índice de desarrollo promedio obtenido para todos los tratamientos demuestra que, a los 30 días de cultivo, el mayor índice de desarrollo se obtuvo en el tratamiento PETERS_{50%} (fig. 18), con un valor de 227.5 (estadio 2), mientras que el tratamiento KM_{50%} se registró un menor desarrollo con un valor de 66.25, por lo que, los embriones iniciaban el proceso de inhibición (estadio 0).

A los 56 días el índice de desarrollo menor con 208.75 en el tratamiento KM_{12%}; seguido por PETERS_{100%} y KM_{50%} con un ID de 240; lo que indica que el desarrollo en los tratamientos mencionados, se encontraban en el estadio 2, con una diferencia del 40% que continuaban su desarrollo al siguiente estadio (estadio 3). Mientras que para los tratamientos MS_{12%}, PETERS_{12%} y PETERS_{100%} el valor promedio es de 374.16 que ubica a los protocormos en el estadio 3. El valor más alto del índice se registró en el tratamiento MS_{50%}, con un valor de 457, donde el 57% de los protocormos contaban con una hoja (estadio 5).

Durante los 85 días de cultivo, nuevamente el tratamiento KM_{12%} registro el menor ID (valor promedio: 258), el 42% de los protocormos permanecían en el estadio 2, mientras que el resto continuaba su desarrollo al siguiente estadio (estadio 3). Los tratamientos PETERS_{100%} y KM_{50%} se mantuvieron por debajo de 500 con un promedio de 453.7, por lo que el 50% de los protocormos se mantenían en el estadio 5. En los tratamientos restantes los valores del ID fueron de 638.7 al 672.5 este último valor se registró en los tratamientos MS_{12%}, donde el 70 % de los protocormos se encontraban es estadio 7.

Finalmente, a los 134 días de cultivo, el índice de desarrollo de las semillas para *L. autumnalis* el tratamiento KM_{12%} permaneció rezagado, en estadio 2, sin embargo, solo el 30% de las semillas se encontraban en este estadio con un valor de 270; en tanto que, en los tratamientos Ms_{12%} y PETERS_{12%}, el 50% de los protocormos se desarrollaron como plántulas completas; mientras que, en los tratamientos KM_{50%} y PETERS_{100%} el 90% de los protocormos se desarrollaron hasta el estadio 7.

Los tratamientos PETERS_{50%} y MS_{50%} alcanzaron el mayor índice de desarrollo con un valor de 800, por lo que el total de las semillas cultivadas se desarrollaron hasta alcanzar el estadio de plántula completa (estadio 8).

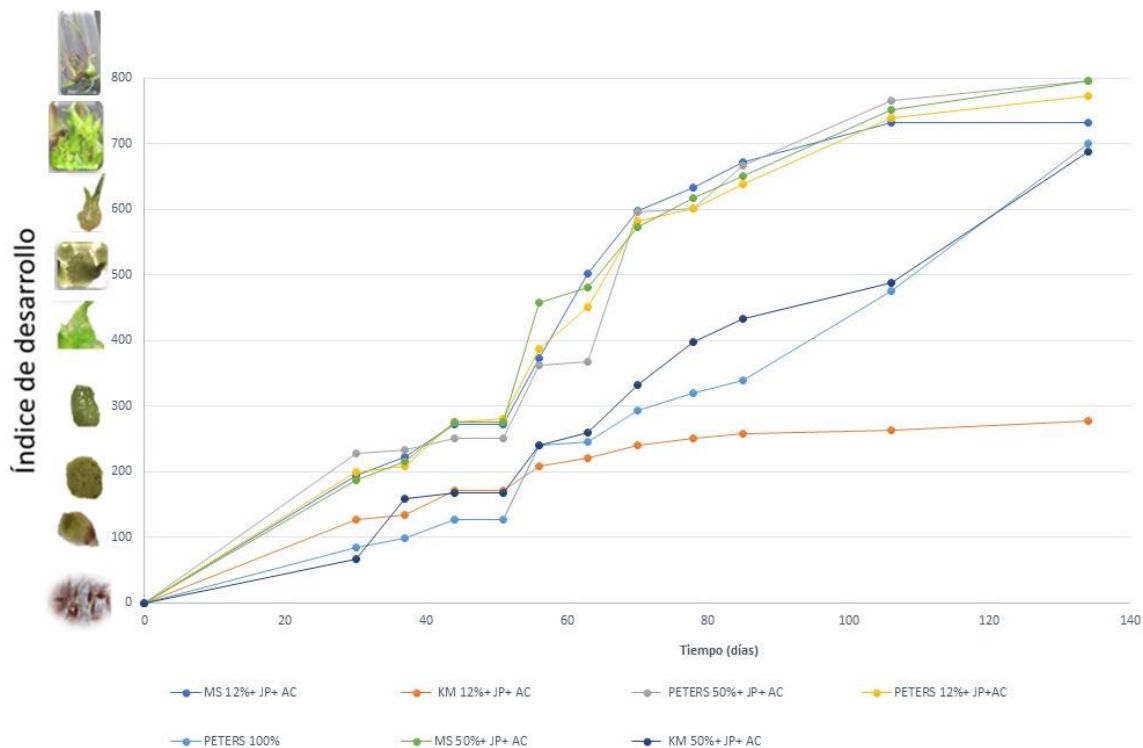


Figura 18. Índice de desarrollo para *L. autumnalis*.

Bletia neglecta

El análisis de varianza (ANDEVA) para el ID (Anexo IV) para las semillas de *B. neglecta*, demostró que existen diferencias significativas, para el tiempo de cultivo (p -valor= 0.0000) y para los tratamientos (p -valor= 0.0034)

Para las semillas de *B. neglecta* el análisis estadístico (ANDEVA) considerando el tiempo de cultivo independientemente del tratamiento, demostró diferencias significativas con un valor de p ($P= 0.0000$) con respecto al tiempo (Anexo IV).

A los 30 días de cultivo, se registró el menor valor medio entre las comparaciones múltiples (81) y 19% de las semillas comenzaron el proceso germinativo (estadio 1).

En contraste, a los 134 días el índice de desarrollo fue de 281, por lo que es estadísticamente diferente y mayor, en comparación al resto de los tiempos

analizados, representando al estadio 3 con un 80%. Mientras que en el periodo de tiempo que va desde el día 37 al 85 permanecen entre el estadio 2 y 3 (fig. 19).

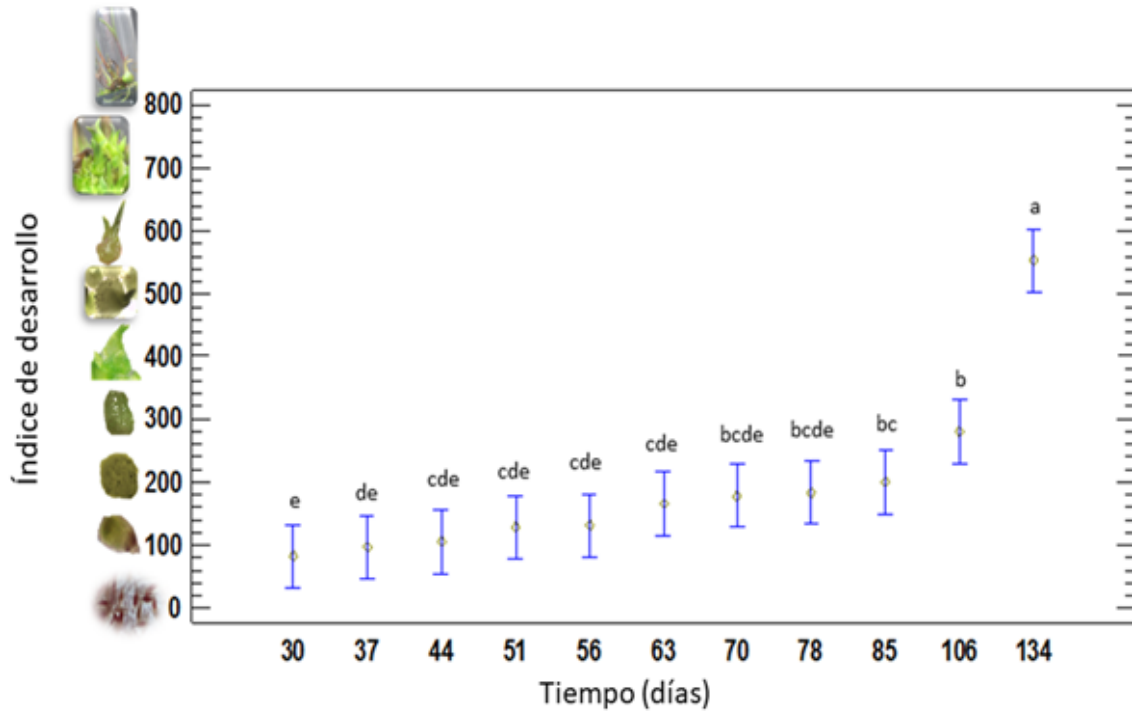


Figura 19. Gráfica de medias e intervalos al 95% LSD. Índice de desarrollo de *B. neglecta* considerando el tiempo del cultivo, independientemente de los tratamientos empleados.

Al realizar las comparaciones múltiples de los valores de las medias del índice de desarrollo en los tratamientos, independientemente del tiempo, se puede ver en la figura 20 que en el medio PETER_{100%} alcanzó el mayor ID con un valor medio de 311, lo que indica que el 89% de los protocormos se encontraban en el estadio 3 (protocormo con primordio foliar), mientras que el 11% se desarrollaron rizoides correspondiente al estadio 4 (protocormo con rizoides); resultando mayor y diferente al resto de los tratamientos, los cuales fueron iguales estadísticamente entre sí y permanecieron en el estadio 2 (protocormo).

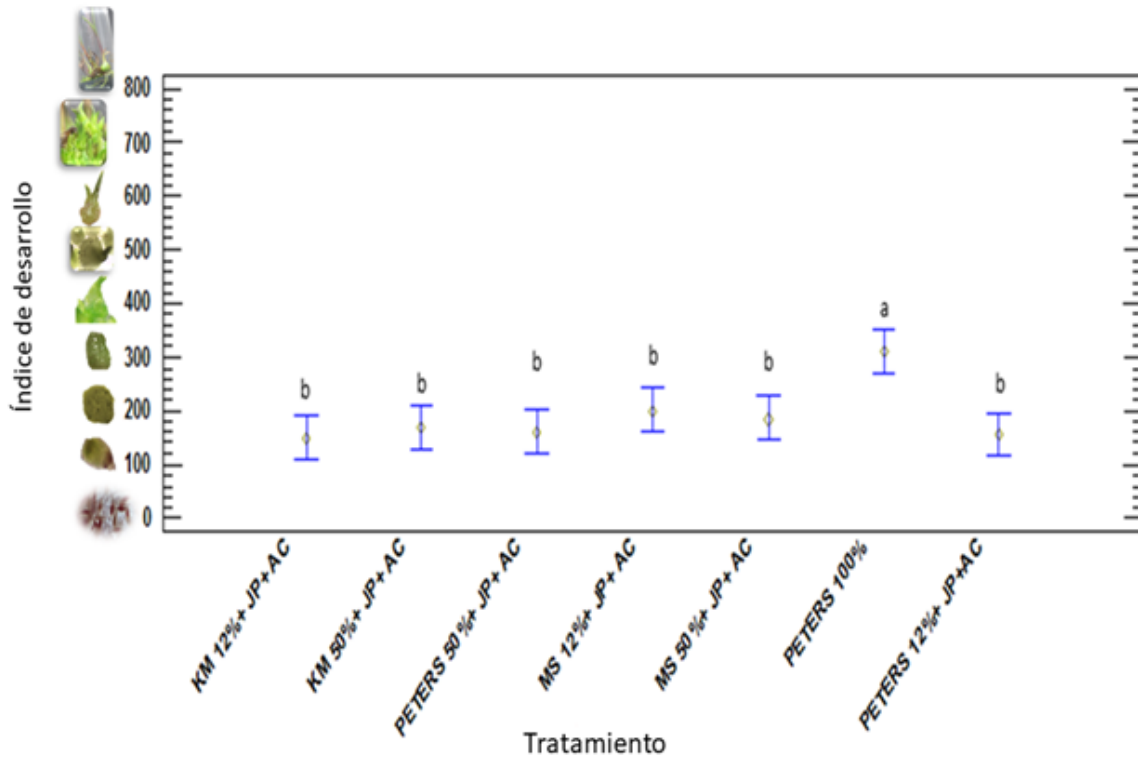


Figura 20. Gráfica de medias e intervalos al 95% LSD. Índice de desarrollo de *B. neglecta* en tratamientos alternativos independientemente a los días de cultivo.

De acuerdo con el ID obtenido para *B. neglecta* (fig. 21), a los 30 días de cultivo, el valor menor (0) se registró en el tratamiento PETERS_{12%}, por lo que las semillas se consideraron sin germinar (estadio 0), mientras que el resto de los tratamientos se mantuvieron entre el 80 y 127, este valor se obtuvo en el KM_{12%}, las semillas se encontraban en su mayoría en el estadio 1 (semilla hinchada y verde).

Para los 56 días de cultivo el ID se mantuvo relativamente constante, sin embargo, se observó una mejor respuesta en los tratamientos KM_{12%} y PETERS_{100%} con un valor de 200, por lo que los embriones se desarrollaron hasta el estadio de protocormo (estadio 2); a su vez en los tratamientos restantes las semillas continuaban su desarrollo en el estadio 1, con un valor promedio de 144, lo que indica que el 44% de las semillas se encontraban en estadio 2.

El tratamiento PETERS_{50%} para el día 85 presentaba el menor ID, con un valor de 138, que mantenía a la mayoría de las semillas en el estadio 1, seguido por los tratamientos PETERS_{12%} y MS_{50%} en donde el 60% de las semillas se encontraban en el estadio 2. Los tratamientos MS_{12%}, KM_{12%} y PETERS_{100%} se mantuvieron entre 258 y 280, lo que indica que el 70% de los protocormos en dichos tratamientos se encontraban en estadio 3.

Al finalizar los registros para el desarrollo de *B. neglecta* a los 134 días, el valor de índice de desarrollo menor fue de 277 en los tratamientos KM_{12%} y KM_{50%}. Por su parte el mayor ID se obtuvo en los tratamientos PETERS_{50%} y MS_{50%} con un valor de 790, lo que indica que la mayoría de las semillas alcanzaron el estadio 8 en dichos tratamientos, seguidos por el tratamiento PETERS_{100%} con un valor de 765, en donde el 35% de los protocormos desarrollaron 3 hojas (estadio 7).

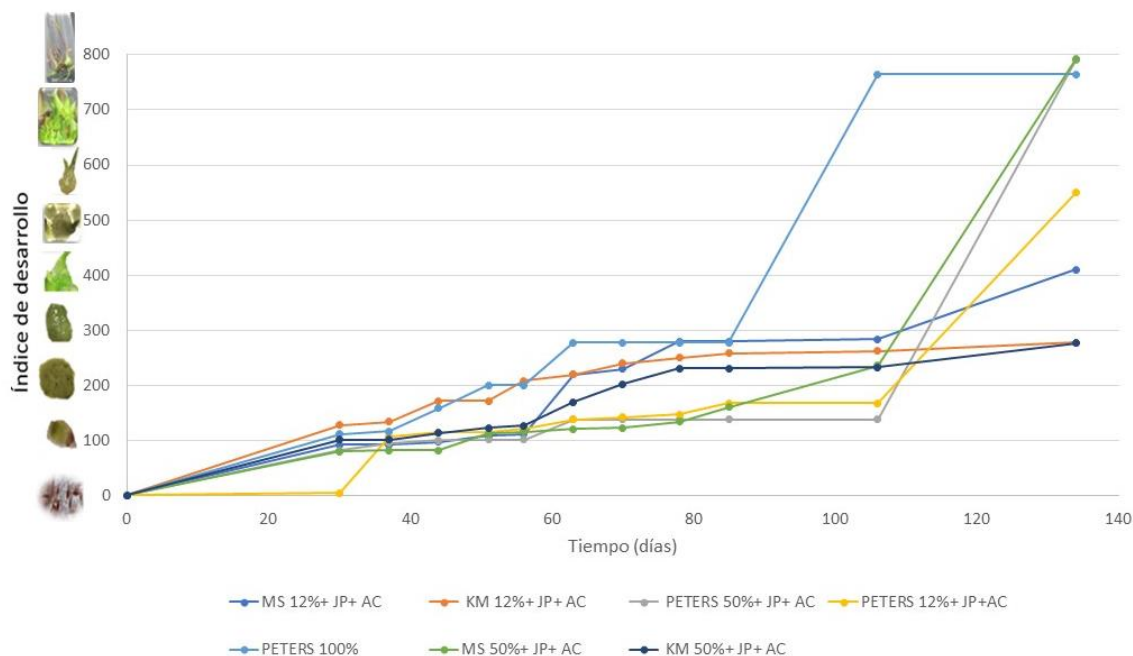


Figura 21. Índice de desarrollo para *B. neglecta*

Prosthechea cochleata

El análisis de varianza (ANDEVA) para el índice de desarrollo (Anexo IV) muestra que, con respecto al tiempo en el caso de las semillas de *P. cochleata*, existe una diferencia estadísticamente significativa para el tiempo con un valor de P de 0.0000; mientras que no mostro diferencia en cuanto los tratamientos con un valor de (P=0.0096).

Aun cuando no existieron diferencias para el ID, independientemente del tiempo, el tratamiento que presento el menor desarrollo fue el PETERS_{100%} con un valor de 89 y el tratamiento con el ID más alto fue el PETERS_{50%} con un valor de 134; sin embargo, el estadio predominante en todos los tratamientos para esta especie con el 70% fue el estadio 1 (semilla hinchada y verde) (fig. 22).

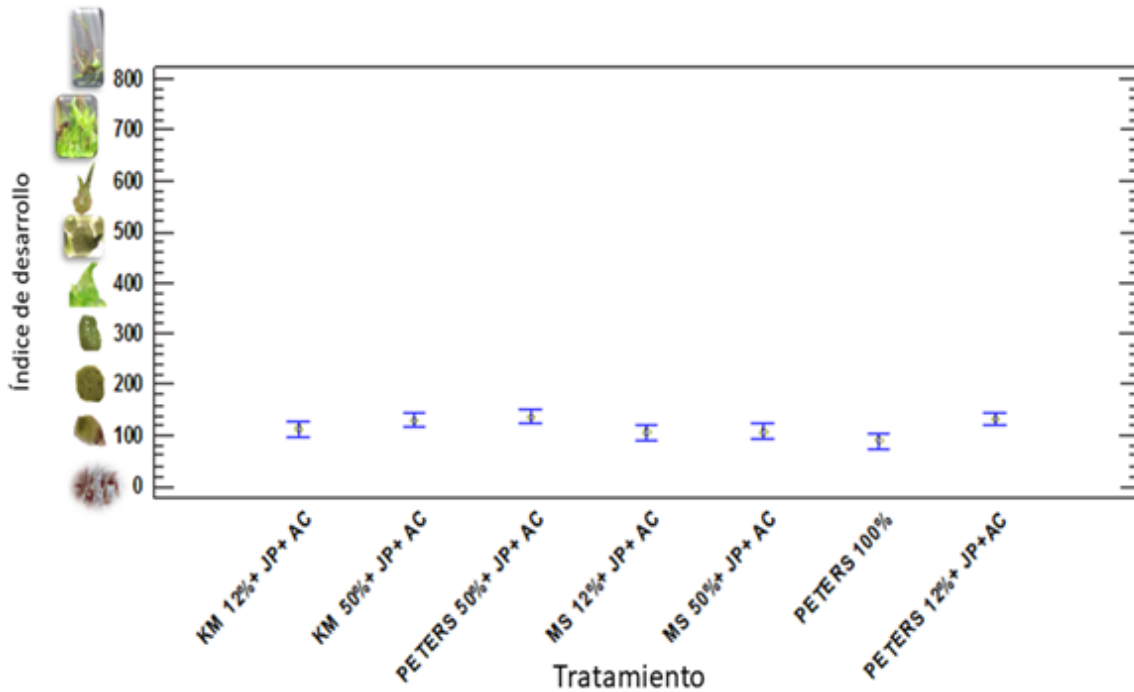


Figura 22. Gráfica de medias e intervalos al 95% LSD. Índice de desarrollo de *P. cochleata* considerando el tiempo del cultivo, independientemente de los tratamientos empleados.

Al comparar el ID a través de tiempo, independientemente de los tratamientos, el valor medio menor (13.82) registrado a los 30 días de cultivo, resultado ser estadísticamente diferente (semillas sin germinar), mientras que el valor a los 134 (201) es mayor y diferente al resto. Los valores en los tiempos intermedios (día 37 al 106) muestra un desarrollo entre el estadio 1 y 2 (fig. 23).

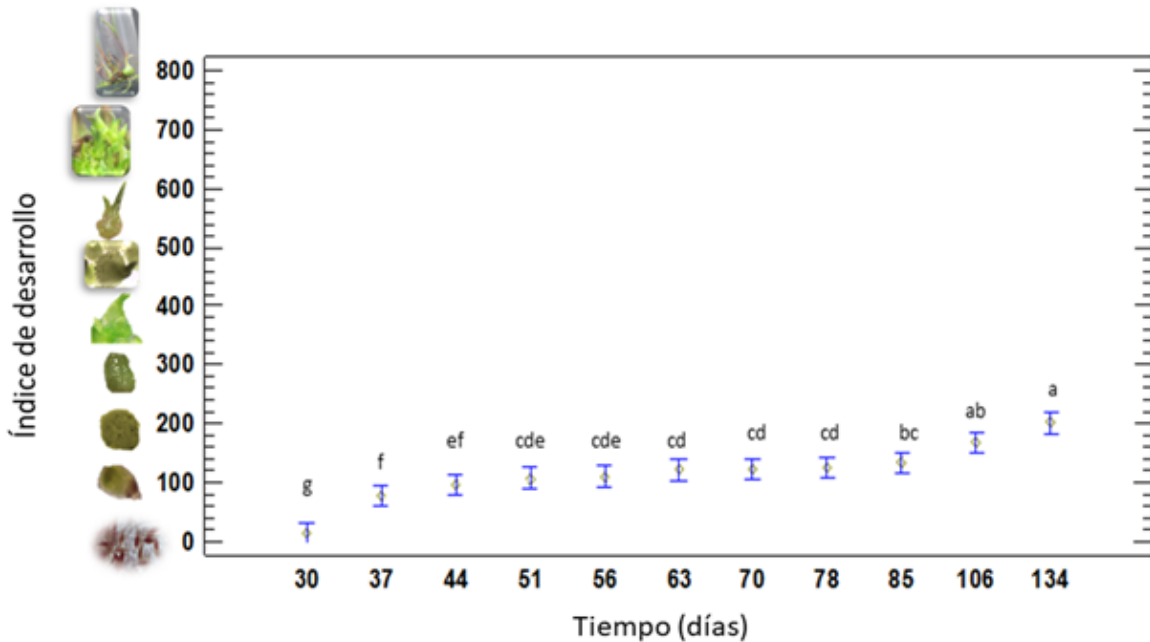


Figura 23. Gráfica de medias e intervalos al 95% LSD. Índice de desarrollo de *P.cochleata* en tratamientos alternativos independientemente a los días de cultivo

Para los 30 días de cultivo el ID obtenido para la mayoría de los tratamientos se mantenía por debajo de 100, el valor más alto de desarrollo se registró en el tratamiento KM_{12%}, con un valor de 67, por lo que el 67% de las semillas se encontraban en el estadio 1 (fig. 24).

El ID a los 56 días se registró con un valor entre el 100 y 120, este último se obtuvo en el tratamiento KM_{50%}, lo que representa que el 80% de las semillas se encontraban en estadio 1, no solo en este tratamiento, si no en todos los medios en general.

A los 85 días de cultivo, el índice de desarrollo se mantenía por arriba de 100 pero menor a 150, en los tratamientos MS_{12%}, KM_{12%}, PETERS_{100%}, KM_{50%} y MS_{50%}, con los registros anteriores, es posible interpretar, que las semillas de dichos tratamientos entraron en un periodo de latencia. Por su parte las semillas cultivadas en los medios PETERS_{12%} (175) y PETERS_{50%} (217) mostraron una mejor respuesta al continuar su desarrollo al estadio 2.

Para los 134 días de cultivo el desarrollo de las semillas continuaba en latencia en el estadio 1, valores medios entre 100 al 140 en los tratamientos MS_{12%}, KM_{12%} y PETERS_{100%}. El índice de desarrollo del resto de los tratamientos se distribuyó en un intervalo de 250 a 270, por lo que el estadio de desarrollo máximo para esta especie fue el estadio 3, el cual se registró en el tratamiento KM_{50%}.

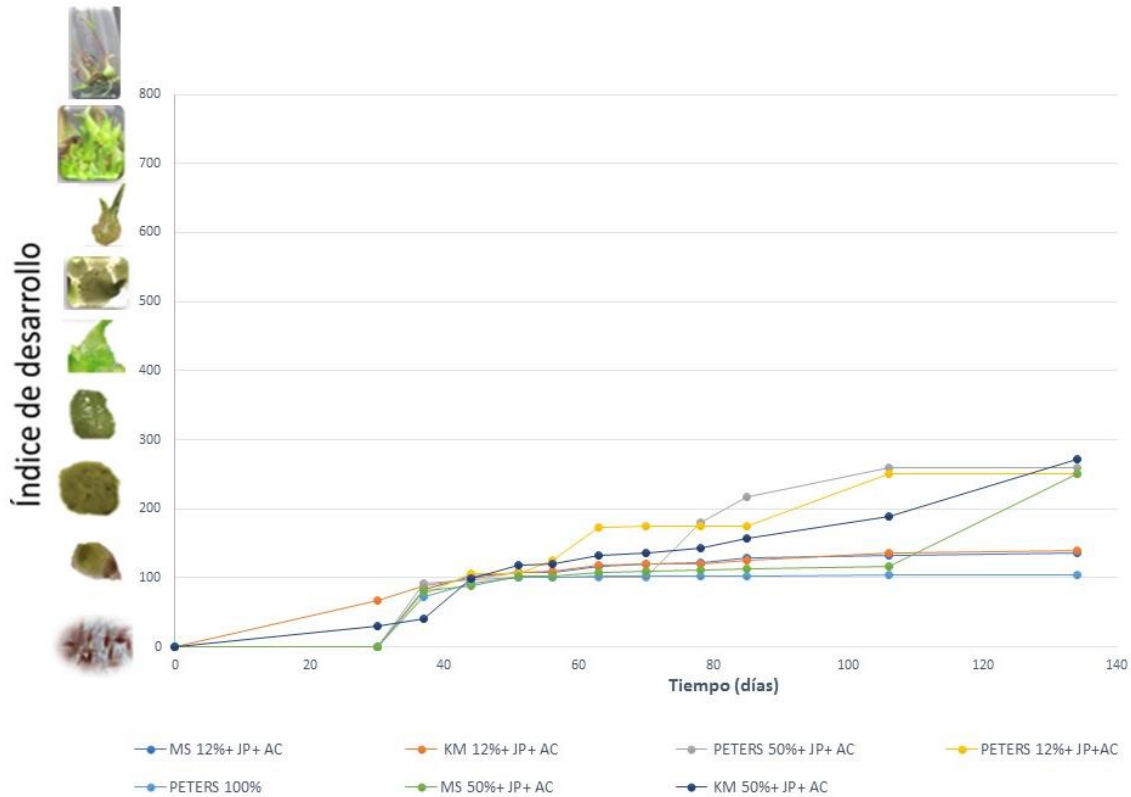


Figura 24. Índice de desarrollo para *P. cochleata*.

Govenia superba

Con respecto al análisis de varianza (ANDEVA) para el índice de desarrollo de *G. superba* mostro diferencias significativas (Anexo IV) en cuanto al tiempo y tratamiento con un valor de P (p -valor=0.0000).

De acuerdo al analisis estadistico en ninguna de las interacciones se alcanzo un valor de ID de desarrollo mayor a 100, sin embargo los valores para los 30 y 37 días son estaditicamente iguales entre si, mostraron ser menores y diferentes al resto de los tiempos, con un ID promedio de 20.56; este valor indica que el 20% de las semillas, se encontraban en el estadio 1 (semilla hinchada y verde), mientras que el 80% restante permanecian sin respuesta aparente.

Las comparaciones multiples para los tiempos de cultivo, independientemente de tratamiento, muestran que en el periodo que va desde el día 44 al 134 con un valor de ID promedio de 41.9 es estadisticamente diferente y mayor con respecto al resto de los tiempos registrados(fig. 25); el 40% de las semillas se hincharon (estadio1), mientras que el 60% permanecio en estadio 0 (semilla sin germinar).

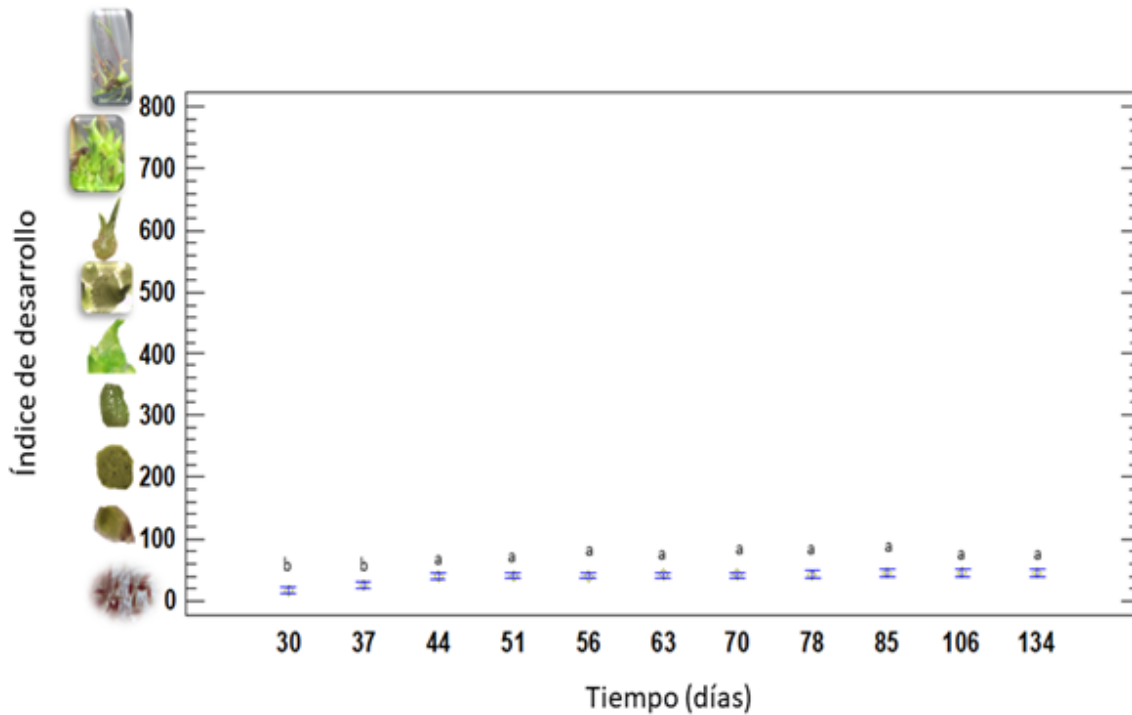


Figura 25. Gráfica de medias e intervalos al 95% LSD. Índice de desarrollo de *G. superba* considerando el tiempo del cultivo, independientemente de los tratamientos empleados

Por otra parte al considerar los tratamientos empleados independientemente del tiempo de cultivo, el ID, mostro que los medios $KM_{50\%}$ y $MS_{12\%}$ son iguales entre si y menores al resto de los tratamientos con un valor medio de 10.9, por lo que el 90% de las semillas se encontraban en estadio 0, sin embargo, guardaban diferencia con otros tratamientos utilizados; mientras que los valores en los tratamientos $MS_{50\%}$, $PETERS_{50\%}$, $PETERS_{100\%}$, y $PETERS_{12\%}$ no muestran diferencia entre sí con un ID promedio de 41.8, por lo que el 42% de las semillas se encontraban en el estadio 1, mientras que el 58% permanecía sin germinar. El medio que representa un valor medio mayor (88.2) fue el medio $KM_{12\%}$, por lo que el 20% de las semillas no presentaban hinchamiento (fig. 26).

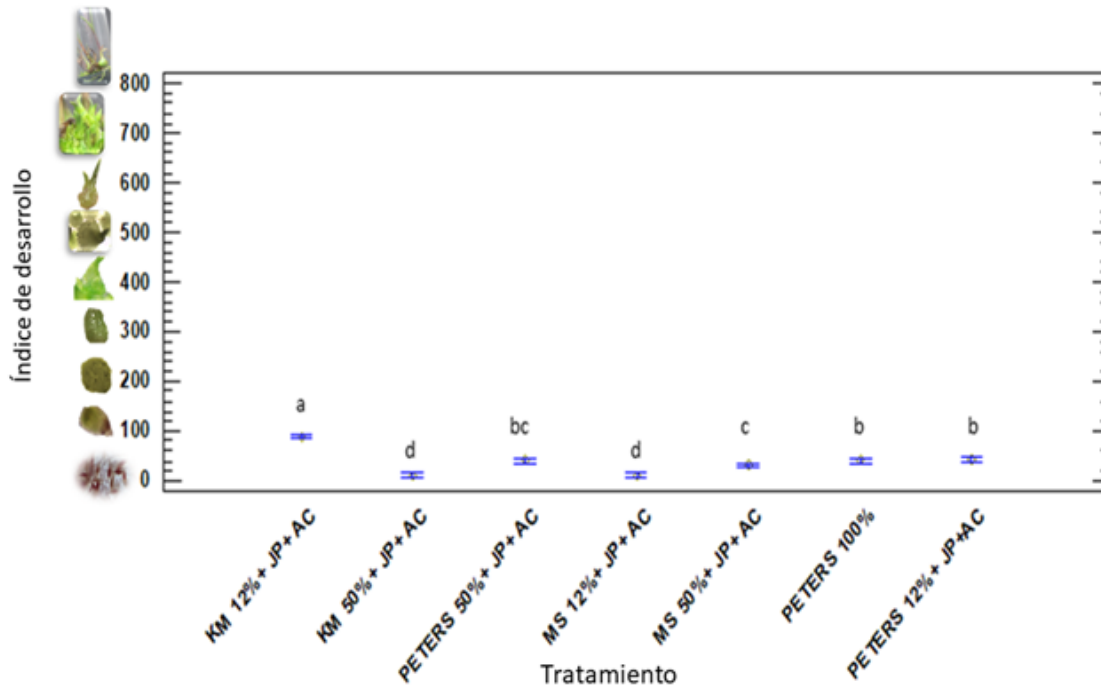


Figura 26. Gráfica de medias e intervalos al 95% LSD. Índice de desarrollo de *G. superba* en tratamientos alternativos independientemente a los días de cultivo.

El desarrollo de las semillas a los 30 días de cultivo para *G. superba*, el ID (fig. 27) muestran que, en todos los tratamientos, se encontraban en el estadio 0 (semillas sin germinar), el tratamiento que muestra el mayor valor de desarrollo es el tratamiento PETERS_{100%} con un valor de 40, seguido por el KM_{12%} (30), mientras que el resto de los tratamientos registran un valor de 10.

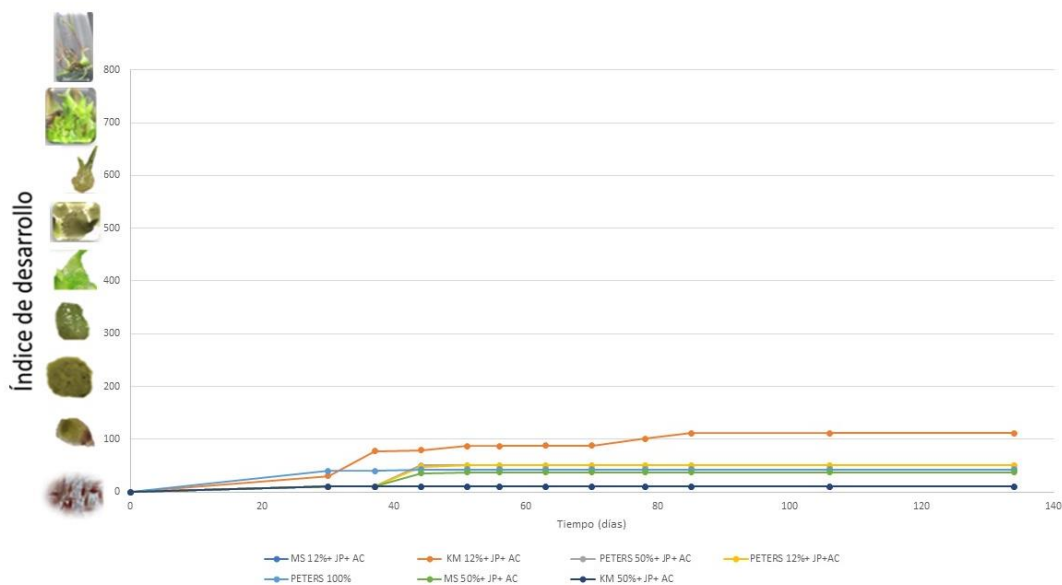


Figura 27. índice de desarrollo para *G. superba*.

A los 56 días de cultivo se da un incremento en los valores del ID, el tratamiento KM_{12%} registra el valor más alto (87) por lo que el 87% de las semillas se encuentran hinchadas (estadio 1). Los tratamientos MS_{50%}, PETERS_{100%} y PETERS_{12%} se mantiene en un intervalo que va desde 37 a 50, en promedio el 40% de las semillas se encontraba en el estadio 1. Por su parte los tratamientos PETERS_{50%} y KM_{50%} permanecían sin cambio aparente.

Para los 85 días de cultivo los tratamientos no registraron cambio observable, excepto el tratamiento KM_{12%}, que registro un desarrollo de 111, por lo que el 90% de las semillas se encontraban en estadio 1 y en 10% restante continuaba su desarrollo al estadio 2 (protocormo).

Al final de las observaciones (día 134) los tratamientos se mantuvieron constantes, sin cambio aparente.

Desarrollo de PLB's

Entre los 30 y los 50 días de siembra se observó la aparición de numerosas estructuras redondeadas, que surgieron de manera directa a partir de las células epidérmicas del protocormo; la morfología de dichas estructuras coincide con lo descrito en la literatura como cuerpos parecidos a protocormo (PLB's, por sus siglas en inglés), con base a los resultados obtenidos, se establecieron dos rutas morfogénicas: directa e indirecta, para identificar el origen y desarrollo de PLB's, hasta la formación de plantas completas, según la especie (fig. 28).

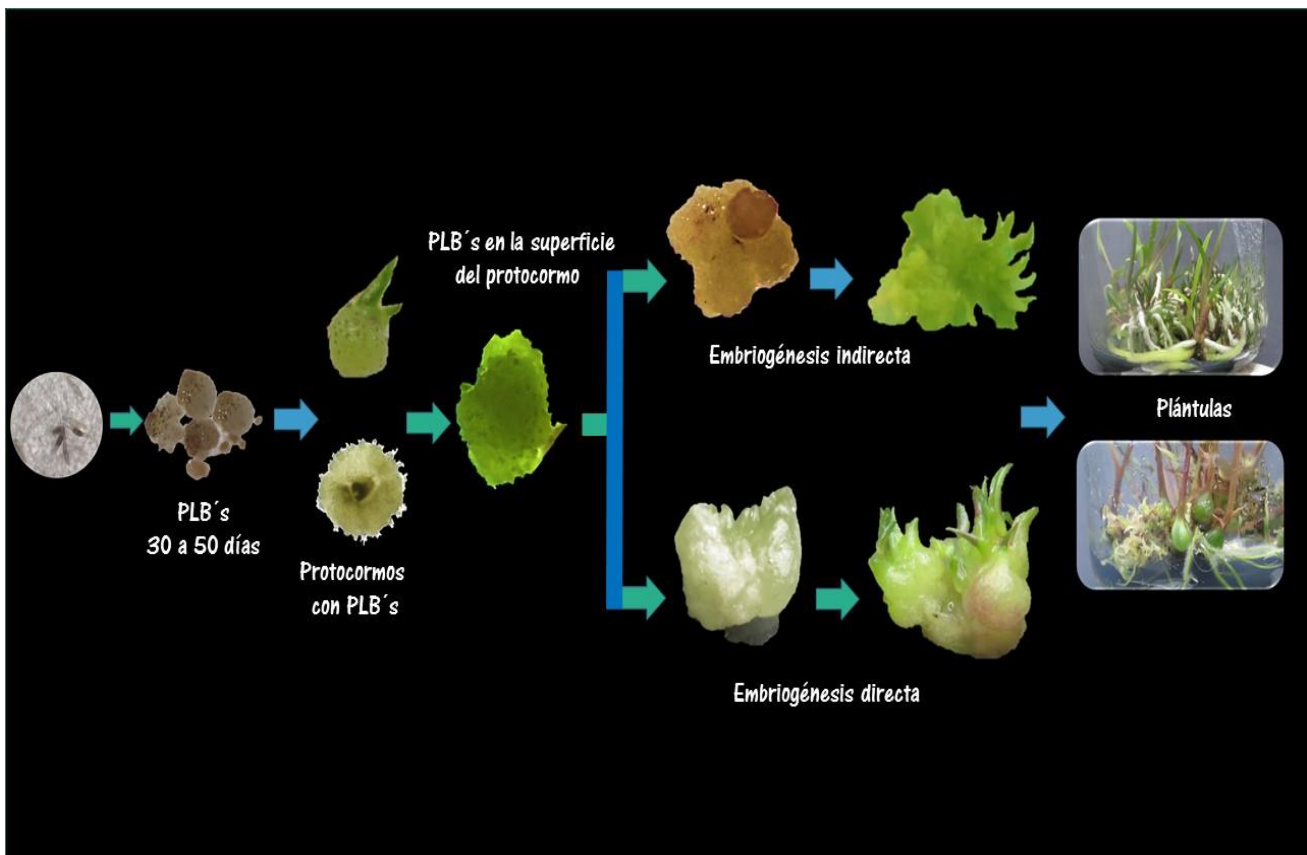


Figura 28. Origen y desarrollo de PLB's.

Esta respuesta fue observada en todos los tratamientos en las diferentes especies, a partir del estadio 3 (protocormo); siendo los tratamientos con PETERS®, con los que se obtuvo la mayor formación de PLB's.

Para *B. neglecta* y *L. autumnalis* en el tratamiento de PETERS_{100%}, se dio la formación de masa callosa (a partir de PLB's) de color verde claro (30 a 52 días, dependiendo de la especie); que continuo su crecimiento hasta los 78 días de cultivo, tiempo en que se diferenció, siguiendo la ruta de embriogénesis somática indirecta hasta la formación de plántulas, o bien la proliferación de la misma masa (fig. 29).

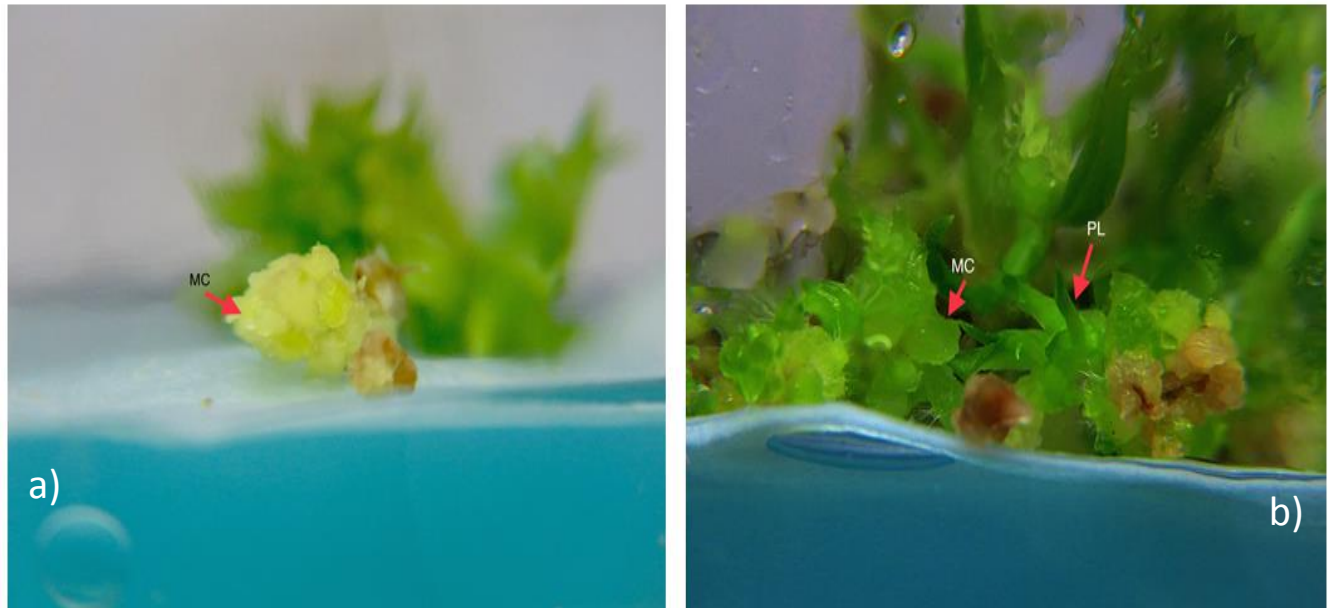


Figura 29. Cultivo de *L. autumnalis* en PETERS_{100%}. a) Masa callosa (MC) desdiferenciada a partir de PLB's a partir de los 51 días de cultivo. b) Proliferación de masa callosa (MC) y formación de plántulas (PL) a partir de PLB's, vía embriogénesis indirecta.

En *B. neglecta*, todas las semillas geminadas desarrollaron PLB's en la superficie del protocormo, que continuaron su desarrollo por vía embriogénesis directa. El tratamiento en el que se dio una mejor respuesta, en cuanto a la formación, proliferación y diferenciación de plántulas completas fue el tratamiento PETERS_{50%} en el cual, se obtuvieron plántulas individuales o en colonias, con un tamaño promedio de 8 centímetros de longitud (fig. 30).

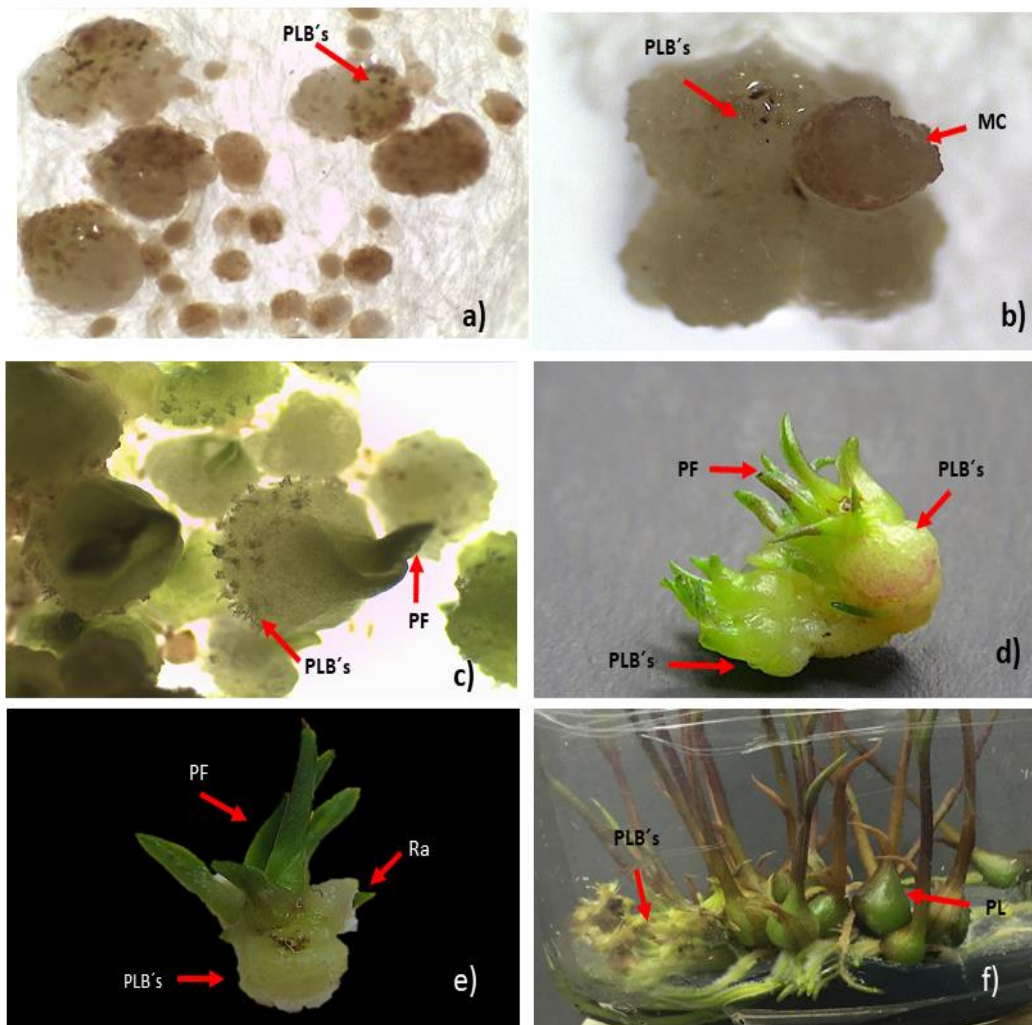


Figura 30. Etapas de desarrollo de PLB's en *B. neglecta*. a) Etapas 1: Protocormos con la presencia de puntuaciones (PLB's) en la superficie. b) Etapa 2 (embriogénesis indirecta): Masa callosa, en división con la presencia de PLB's, en constante división, obtenidas de una sola semilla. c) Etapa 3: Protocormos con primordio foliar (PF), con PLB's en la base. d) Etapa 4: PLB's con múltiples primordios foliares, sin la presencia de raíces. e) Etapa 5: Plántula (PL) completa con la aparición de radícula (Ra), sin embargo, continua la proliferación de PLB's en la parte basal. f) Etapa 6: Plantas completas en colonia, con un gran número de PLB's diferenciándose a partir de los meristemas del cormo.

Por otro lado, los protocormos generados en los tratamientos a base de sales basales MS, presentaron la formación de PLB's, desarrollándose de forma directa, en *L. autumnalis*. Se observó que en el tratamiento al 50%, la formación de PLB's fue muy alta al igual que en la concentración 12%, ya que el total de semillas germinadas contaba con la presencia de estos, en todas las repeticiones, sin embargo, en este tratamiento el número de plántulas que completaron las etapas de desarrollo fue menor (fig. 31).



Figura 31. Plántulas de *L. autumnalis* con alta proliferación de raíces y presencia de velamen, en tratamiento MS_{50%}, a partir de la diferenciación de PLB's.

Las semillas de *G. superba* no respondieron favorablemente a la composición del medio de cultivo, por lo que mostraron oxidación o un bajo porcentaje de germinación. Sin embargo, en el medio KM_{12%} y en el MS_{50%} se observó la aparición de cuerpos parecidos a protocormo, entre los 51 y 70 días después de la siembra. Posteriormente los PLB's se desarrollaron indirectamente, formando una masa callosa, que no presentó crecimiento ni proliferación (fig. 32).



Figura 32. Protocormos de *G. superba* cultivados en KM_{12%} con la presencia de PLB's en la base, a los 51 días de cultivo, siguiendo la vía indirecta de diferenciación.

Por último *P. cochleata* a pesar de tener un proceso germinativo lento en relación con las otras especies estudiadas, la aparición de los PLB's se vio mejor representada en los tratamientos KM, en aquellos en especial en los tratamientos a una concentración al 12%.

Es importante mencionar que en todos los tratamientos se encontró la presencia de PLB's, en las diferentes etapas de desarrollo para esta especie (fig. 33).

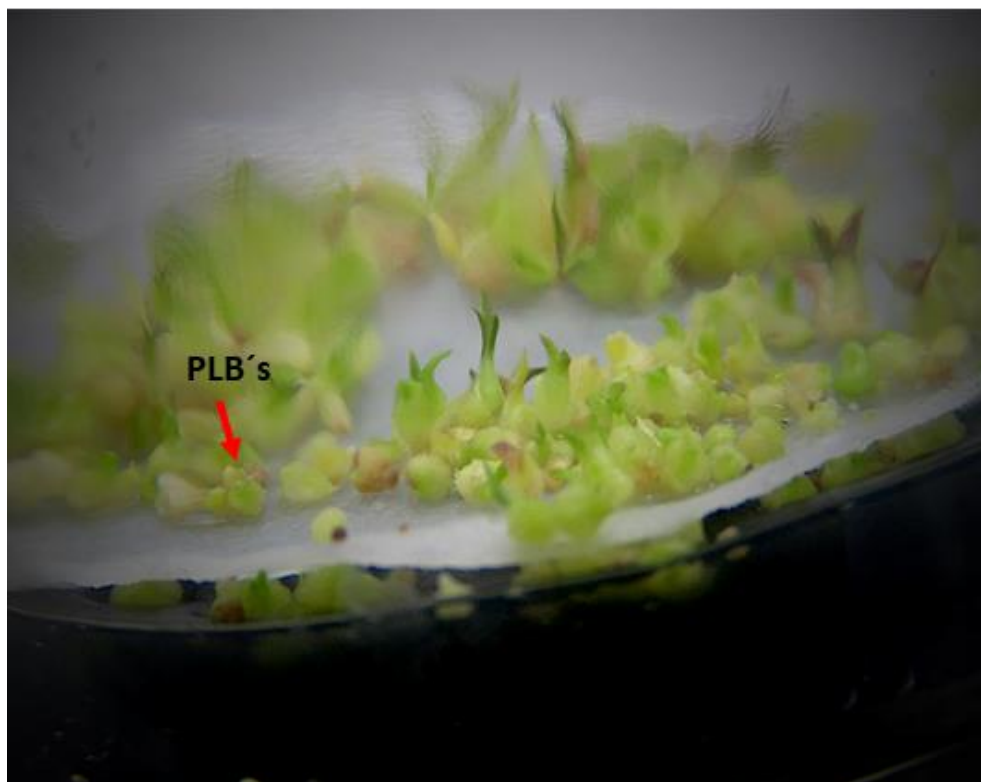


Figura 33. Protocormos de *P. cochleata* con el desarrollo de PLB's en cultivo *in vitro*.

Origen y desarrollo de PLB's de acuerdo al análisis anatómico e histológico

Por medio de las observaciones anatómico-histológico fue posible identificar la ontogenia, no solamente de las plántulas, sino también de algunas estructuras obtenidas *in vitro*, desde los primeros estadios de desarrollo (fig. 34) hasta la formación de plántulas completas.

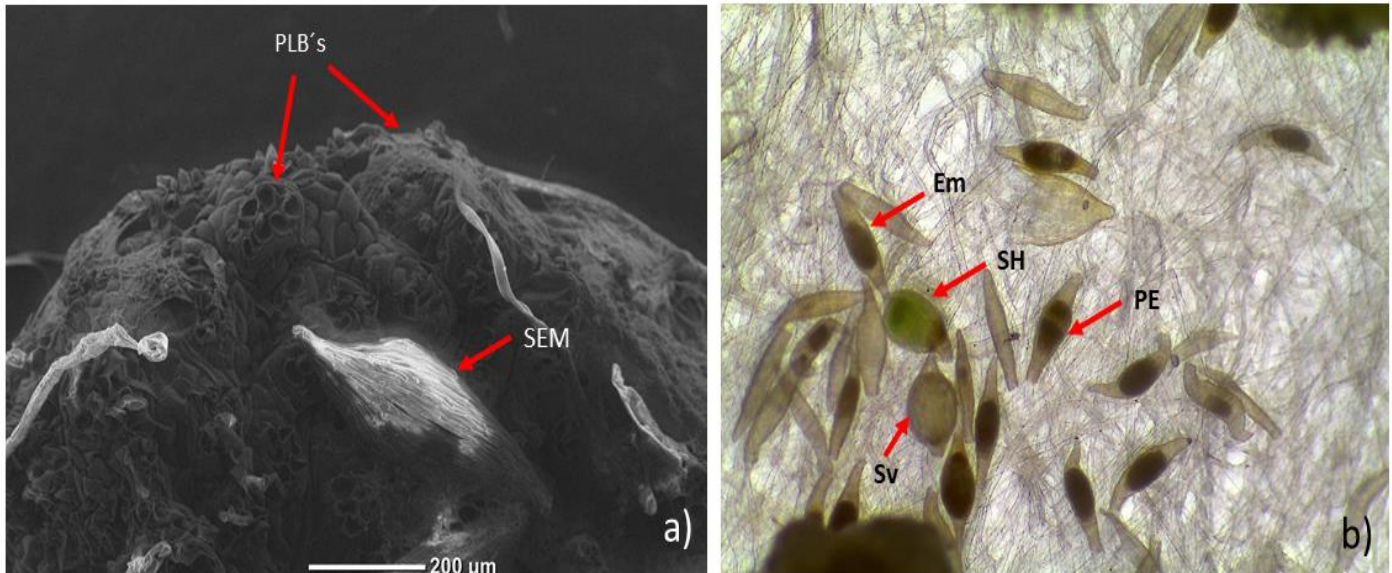


Figura 34. Semilla de *Laelia autumnalis*. a) Fotomicrografía que muestra una semilla (SEM) sin germinar adherida a la superficie del protocormo con una longitud de 514.62 µ y un ancho en la parte media de 183.9 µ; así como la presencia de PLB's en estadios tempranos de desarrollo. b) Fotografía con estereoscopio LEICA (40x) donde se observan semillas vanas (Sv), semillas poliembriónicas (PE), así como también se observa el primer estadio de desarrollo "semillas hinchada y verde" (SH). En promedio el embrión (Em) en esta especie presenta de largo 49.069 µ y de ancho en la parte media 60.159 µ.

Con base a las observaciones obtenidas, fue posible confirmar que los PLB's se originan del tejido epidérmico del protocormo, desde sus primeras etapas de desarrollo, en todas las especies. Con la aparición de 8 a 10 células conglomeradas formando zonas meristemáticas, distribuidas en la base del protocormo, y alto contenido de material genético, por lo que se encontraban en división; dichas células mostraron las características típicas de PLB's (fig. 35).

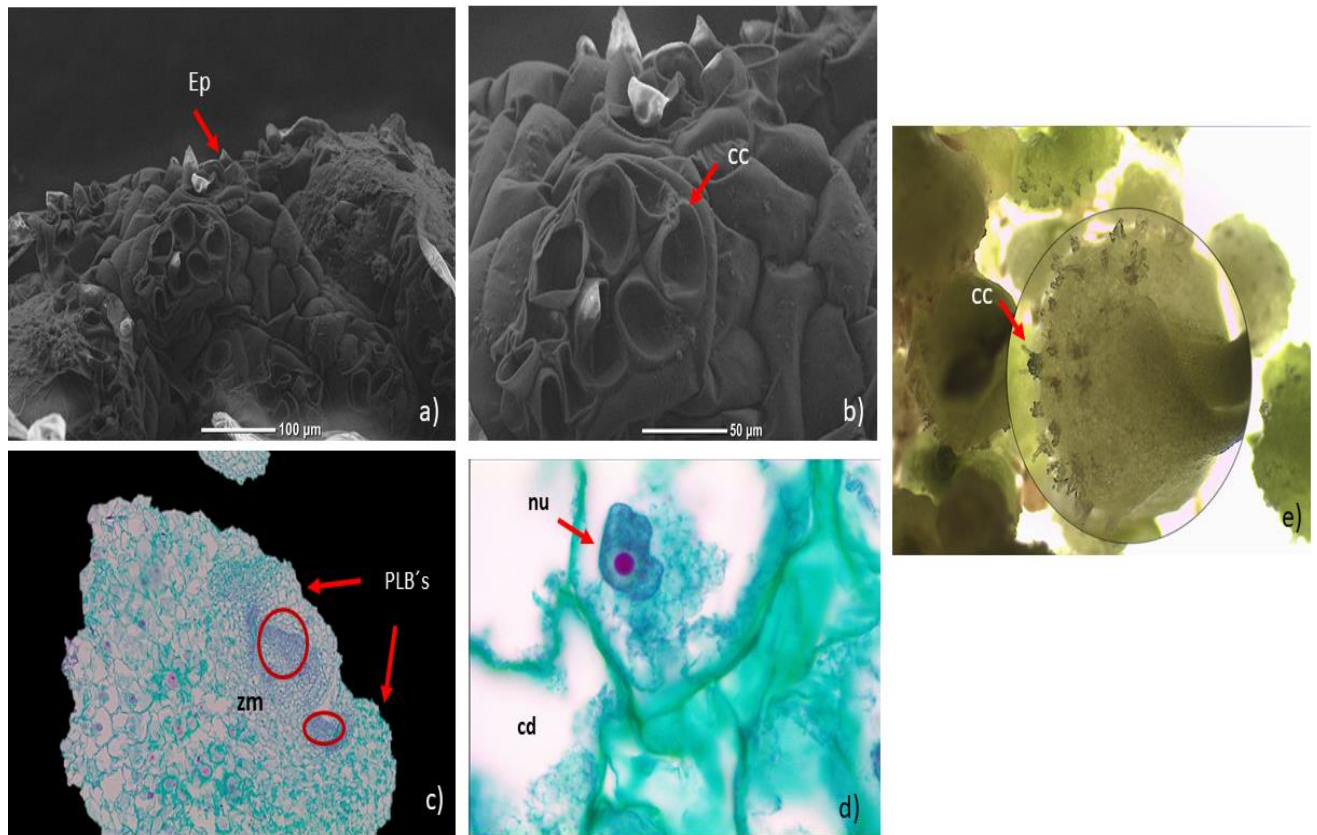


Figura 35. Origen de PLB's en distintas etapas de desarrollo en las especies estudiadas. Micrografías de barrido y tinción safranina-verde rápido a) Epidermis del protocormo (Ep). b) Células conglomeradas (cc) indiferenciadas distribuidas al azar. c) Presencia de zonas meristemáticas (zm), d) Célula típica de PLB's, con núcleo definido (nu), citoplasma denso (cd). e) Protocormo *in vitro* (estadio 3) con PLB's jóvenes de *L. autumnalis*.

Por lo anterior la descripción se centrará en los PLB's, la primera etapa observada fue la formación de zonas de intensa división principalmente en la superficie, distribuidas al azar en la base del mismo. Las cuales mostraban células con características meristemáticas: indiferenciadas, núcleos definidos y citoplasma densos.

Posteriormente los PLB's jóvenes continuaron su desarrollo a partir de las zonas meristemáticas, organizándose alrededor de todo el protocormo original, como embriones somáticos independientes, que a su vez dieron origen a la formación de nuevos protocormos con primordios foliares (fig. 36).

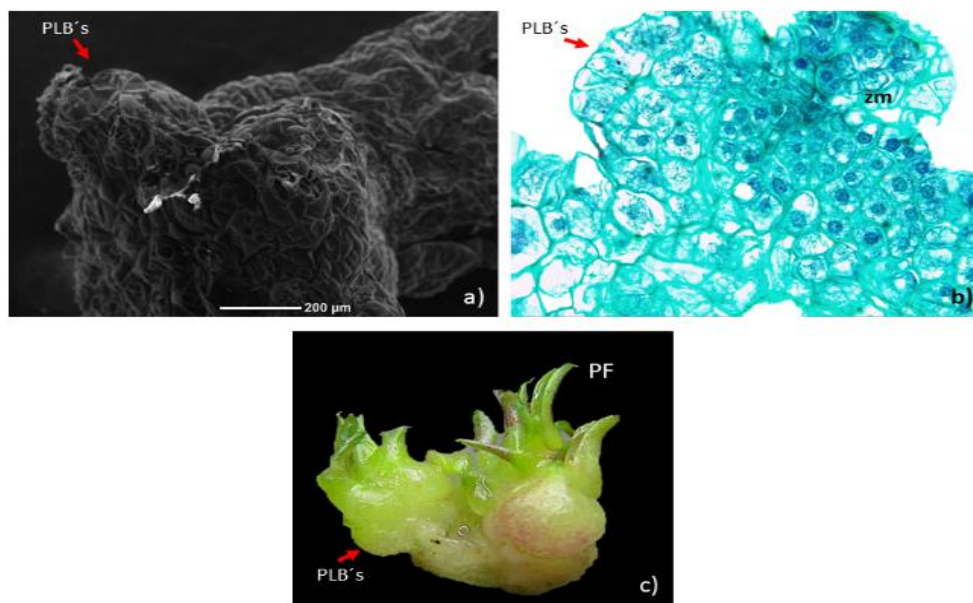


Figura 36. Desarrollo de PLB's alrededor del protocormo original. a) Fotomicrografía mostrando las protuberancias (PLB's) en la parte inferior del protocormo original. b) Corte histológico (tinción safranina-verde rápido) mostrando zonas meristemáticas y desarrollo de PLB's. c) PLB's obtenidos *in vitro* con el desarrollo de múltiples primordios foliares.

A la par de la formación de PLB's, las plántulas madre continuaron el desarrollo típico de las estructuras embrionarias, es decir la presencia de meristemo apical, formación de hojas y meristemo radicular (fig. 37).

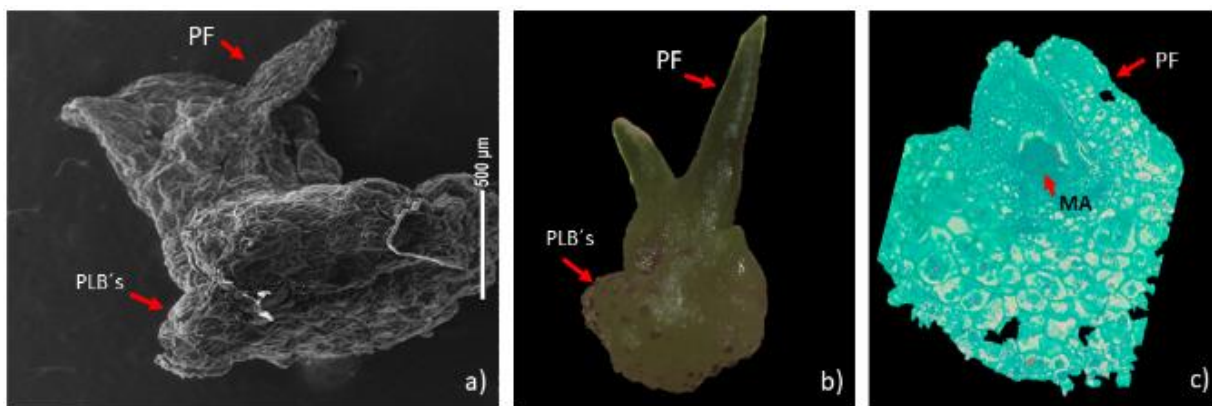


Figura 37. Formación de estructuras embrionarias en la planta madre. a) Fotomicrografía con la presencia de PLB's y la formación de primordios foliares (PF). b) plántula con la presencia de primordios foliares y múltiples PLB's en la base en diferentes estadios de desarrollo. c) Emergencia del primordio foliar y la presencia del meristemo apical (MA)

En la figura 38 se puede observar el surgimiento de la radícula, así como también PLB's en la parte basal en las primeras etapas de desarrollo.

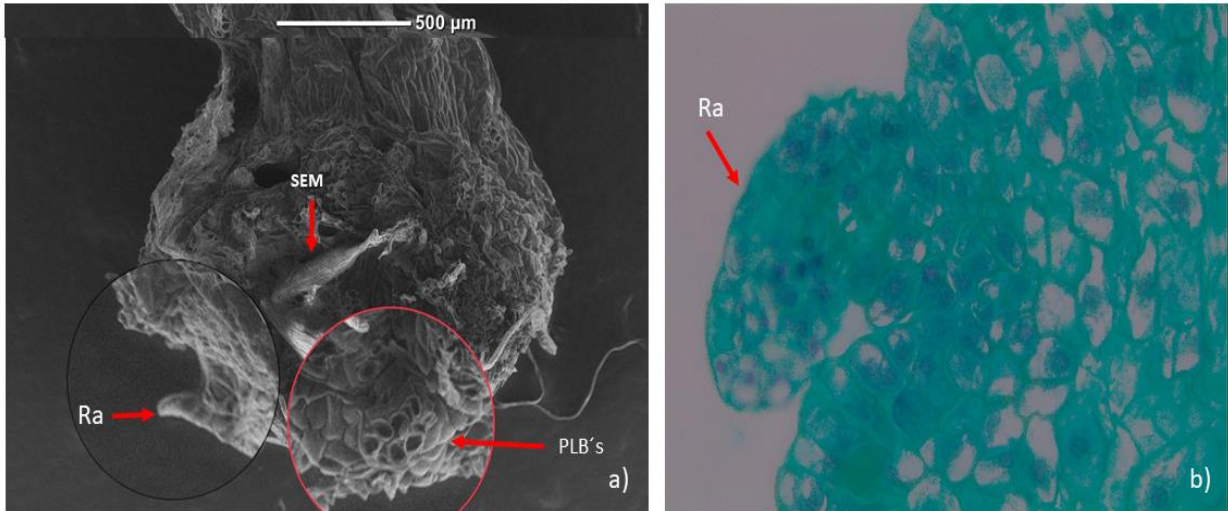


Figura 38. a) Fotomicrografía donde se muestra el surgimiento de la radícula (Ra) y la proliferación de PLB's en la parte basal del protocormo, se puede observar una semilla (SEM) sin germinar, adherida a la superficie del mismo. b) Corte histológico con la tinción safranina-verde rápido, donde se observa la diferenciación de la radícula.

Identificación de contenidos celulares

Por medio de la aplicación de diversas técnicas de tinción específicas fue posible la identificación de contenidos celulares.

La tinción de contraste safranina- verde rápido, mostró la presencia de lípidos (gotas) dispersas en toda la superficie del corte, sin importar el tipo de célula y su estadio de desarrollo (fig. 39).

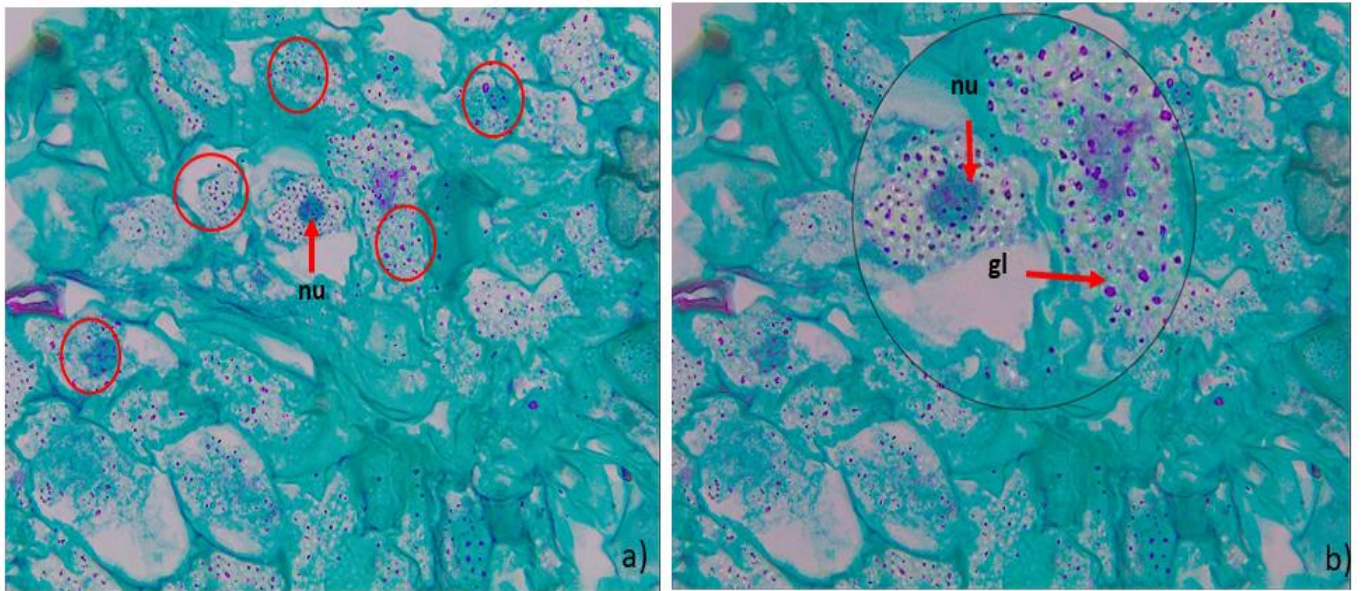


Figura 39. Gotas de lípidos distribuidas aleatoriamente. a) Gran cantidad de gotas de lípidos (gl) en las células (círculos rojos). b) Acercamiento que muestra el núcleo (nu) de una célula parenquimática con presencia de gotas de lípidos dispersas por el citoplasma sin arreglo aparente.

Al realizar la tinción con lugol para la identificación de almidón, no se observaron depósitos de esta biomolécula (fig. 40) debido a que, en algunas especies, su presencia es escasa o nula en etapas muy tempranas de desarrollo.

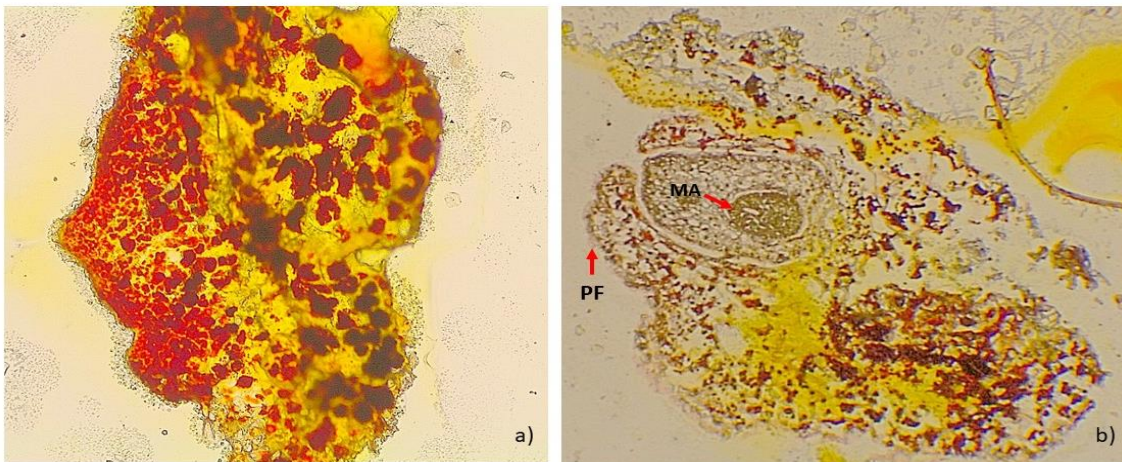


Figura 40. Identificación de almidones. a) La coloración marrón indica la ausencia de almidones al no ser teñidos por el lugol (azul intenso). b) Aparición de primordio foliar (PF) y numerosos depósitos de almacenamiento celular (color marrón), así como también la diferenciación del meristemo apical (MA).

Para la identificación de proteínas, se observaron depósitos en el plano ecuatorial de la célula de gran tamaño en todo el protocormo (fig. 41).

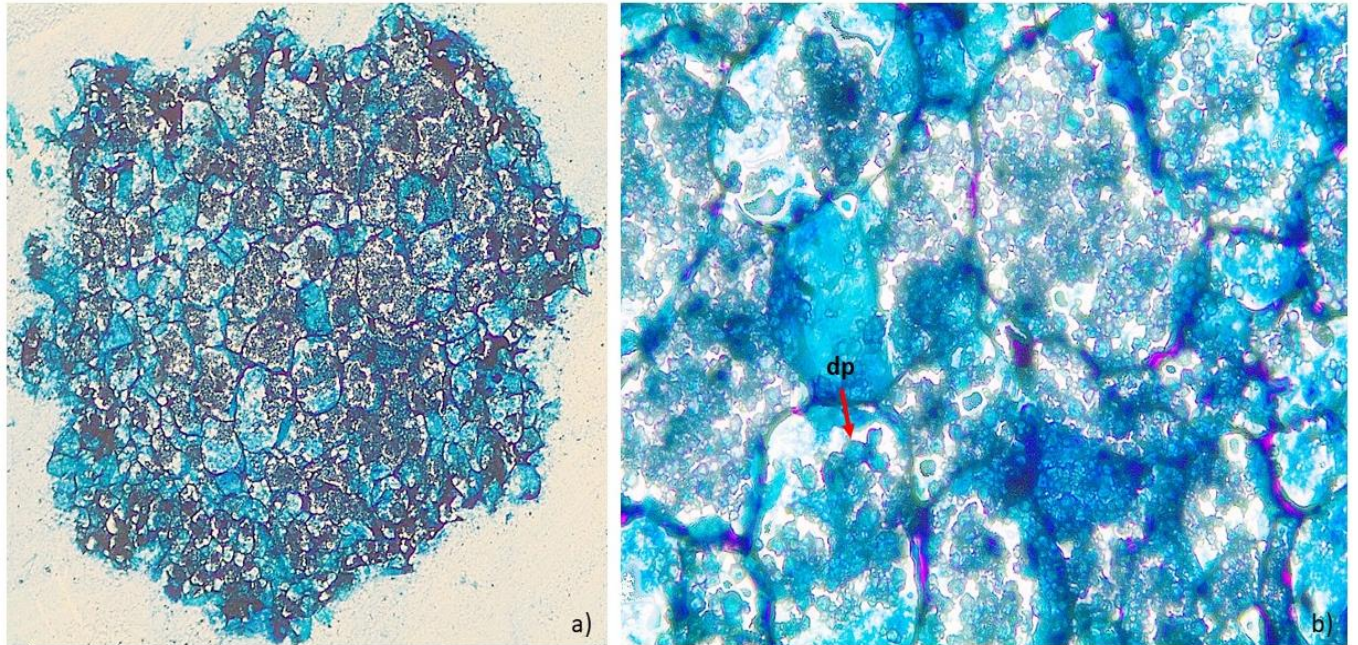


Figura 41. Identificación de proteínas. a) Tinción con azul negro de naftol. b) Depositos de proteínas (dp) en células parenquimáticas.

La presencia de sustancias de reserva, indica que los protocormos y los PLB's, tienen la capacidad de almacenar biomoléculas que son utilizadas durante el desarrollo, para la formación de compuestos más complejos que son aprovechados en los procesos fisiológicos.

Discusión

Viabilidad

De acuerdo con Pedraza-Santos (2017) las correctas condiciones de almacenamiento de las semillas permiten que la viabilidad se mantenga hasta en un 50% de 8 a 14 años, sin embargo, deben definirse para cada especie. Los resultados obtenidos difieren de sus resultados ya que en la prueba de TTC para todas las especies estudiadas fueron mayores al 70%, considerando que el tiempo almacenamiento iba de 5 a 13 años, lo que permite su almacenamiento a bajas temperaturas manteniéndolas en óptimas condiciones para su aprovechamiento (semillas ortodoxas).

Al comparar la germinación *in vitro* de las semillas, la mayoría de las especies alcanzó el porcentaje máximo de germinación, con excepción de *Govenia superba*, lo que indica que la prueba con TTC no es adecuada para esta especie.

El alto porcentaje de viabilidad obtenido en esta investigación es importante ya que en diversos estudios (Lee-Espinosa et al., 2007; McKendrick, 2000; Pérez, 2014; Vergara-Galicia et al., 2010) se recomienda la utilización de semillas provenientes de cápsulas recién colectadas o con pocas semanas de almacenamiento, sin embargo, con los resultados obtenidos se comprueba que es posible utilizar semillas almacenadas en condiciones adecuadas.

Cultivo *in vitro*

Dentro de las orquídeas, cada especie tiene requerimientos nutricionales específicos dependiendo de su distribución y hábito. Por esta razón se hace necesario experimentar con diferentes composiciones de medio, ya que la respuesta de los embriones estará directamente relacionada con la composición del medio de cultivo utilizado para la inducción de la germinación.

Tras el desarrollo de los primeros medios de cultivo para la germinación *in vitro* de orquídeas (Knudson, 1952) se han implementado distintas formulaciones para cumplir dicho objetivo; la utilización de complejos orgánicos se remonta hasta las primeras prácticas de cultivo *in vitro*.

El medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) se ha reportado en la germinación de un gran número de plantas, por su alto contenido de sales inorgánicas, carbohidratos y vitaminas, que, junto con la adición de fitohormonas; promueven tanto la germinación como la proliferación de tejidos, acortando el tiempo de respuesta.

Existen en el mercado muchos medios de cultivo para la propagación de orquídeas. En el laboratorio de la UIBV, se han realizado estudios (Duarte Salinas, 2014; Rodríguez Farfán, 2013) con el medio KM (Kao & Michailuk, 1975), utilizado

generalmente en el aislamiento de protoplastos, obteniendo resultados favorables en la propagación de especies de orquídeas con interés comercial y amenazadas (Aqeel et al., 2016).

El uso de fertilizantes comerciales como base del medio de cultivo se debe a que contienen nutrimentos como N, P y K en forma solubles, además de disminuir considerablemente los costos de producción a gran escala, obteniendo resultados semejantes al utilizar medios de cultivo convencionales (Romero-Tirado, Luna-Rosales, & Barba-Álvarez, 2007).

Además de los componentes inorgánicos, los complejos orgánicos, fueron parte esencial de la composición del medio de cultivo, la utilización del endospermo líquido de coco es una de las más conocidas y con mejores resultados reportados para la germinación de orquídeas *in vitro* (Haberlandt, 1902; Krikorian & Berquam, 1969; Laimer & Ucker, 2003; Yam & Arditti, 2009).

Kuraishi & Okumura (1961) demostraron que, al agregar agua de coco al medio de cultivo, se conseguía el mismo efecto que al agregar una citocinina reconocida, logrando un efecto benéfico sobre el crecimiento o la morfogénesis, que a menudo depende de la presencia de una citocinina. También se ha informado sobre la aparición de sustancias semejantes a las giberelinas.

Por su parte el efecto del jugo de piña no es claro, se sabe que es rico en carbohidratos solubles (fructosa, glucosa y sacarosa), vitaminas, aminoácidos y fitohormonas que permiten un mayor crecimiento y desarrollo *in vitro*.

Con base en estos trabajos, en esta investigación, se emplearon tanto las concentraciones de las sales minerales, como el uso de los complejos orgánicos. Cabe resaltar que los compuestos orgánicos, se usaron de manera conjunta, aspecto que no había sido probado, ya que, comúnmente se utilizan de manera individual.

La germinación de las semillas se presentó en los primeros 30 días de cultivo en todos los tratamientos, con ello es probable que la adición, tanto del agua de coco como del jugo de piña a las diferentes concentraciones de sales minerales acelere el proceso germinativo, ya que proporciona sustancias de crecimiento naturales altamente activas (George, Hall, & De Klerk, 2008).

Si bien existieron diferencias en la composición química de los tratamientos empleados, principalmente en la proporción de macro y micronutrientes, seis de los siete tratamientos, fueron suplementados con complejos naturales, para potencializar su eficiencia (agua de coco y jugo de piña). Estos complejos orgánicos son fuentes de aminoácidos, antioxidantes, minerales, ácidos orgánicos y agentes promotores del crecimiento vegetal adecuados para la germinación (Santiago-Jerónimo, Carballar-Hernández, & Chávez-Ávila, 2015)

La mayoría de las especies reaccionaron favorablemente a la adición de los complejos orgánicos, así como también a la concentración de sales minerales. De acuerdo con el análisis estadístico, los tratamientos PETERS_{50%} y MS_{50%} para las especies *Laelia autumnalis* y *Bletia neglecta* obtuvieron una mejor respuesta, no solo en la germinación (que fue del 100%) también en la obtención de plántulas completas: lo que corresponde con lo reportado por Salazar (2012), quien obtuvo el mejor porcentaje de germinación de *Cattleya mendelii* en MS adicionado con 200 ml/L de agua de coco, con un porcentaje de germinación de 93%. A su vez también concuerda con Ruíz y su equipo en 2008, que con diferentes medios de cultivo y compuestos orgánicos lograron germinación *in vitro* de *Encyclia adenocaula* con resultados óptimos y un porcentaje de germinación del 80%, logrando establecer plántulas *ex vitro*.

Se ha observado que en algunas orquídeas, particularmente las epífitas y litófitas, el proceso de germinación puede ser afectado de manera negativa por altas concentraciones de compuestos orgánicos, ya que generalmente viven en hábitats con deficiencia de nutrientes (Damon, Guerrero, Rivera, & Nikolaeva, 2004; Flores, Legaria, Vásquez, & Colinas, 2008), en el caso de las especies estudiadas la mayoría respondió de manera favorable a la alta concentración y a la combinación de los complejos naturales, sin embargo *Govenia superba* mostró un porcentaje de germinación de 37%, por lo que no se desarrolló de manera favorable, esto puede deberse a que en algunos casos los complejos naturales no siempre tienen un efecto inductor de la germinación, como lo reportan Obaidul y colaboradores (2000). Se ha reportado en trabajos anteriores (Navarro & By-nc-, 2009; Padrón Hernández, 2006) que las semillas de *Govenia capitata* germinan a una gran concentración de nutrientes, lo que coincide con lo observado, ya que los tratamientos KM_{12%}, PETERS_{50%} y PETERS_{100%} presentaron una mayor respuesta para esta especie.

Índice de desarrollo

Un aspecto importante en la micropropagación vegetal es evaluar el desarrollo a lo largo del cultivo. En las orquídeas esta evaluación se dificulta, ya que sus semillas son muy pequeñas, como ya se indicó, además la cantidad de semillas, en cada repetición es grande, por lo que es difícil, la evaluación del desarrollo de manera individual.

Por lo anterior es Spoerl en 1948 propuso una manera de evaluarlo al que denominó índice de desarrollo, parámetro que permite realizar un análisis de este proceso, donde al registrar las medidas de crecimiento, las frecuencias obtenidas se usaron para calcular un índice de desarrollo, en cada especie y por cada tratamiento. Esta técnica se ha encontrado más adecuada para las mediciones de desarrollo en las orquídeas.

Esta técnica consiste en: el establecimiento de clases o estadios con los valores obtenidos: la clase (1) consistía en semillas no germinadas; las siguientes cuatro clases contenían etapas intermedias; y la última clase incluyó plántulas con

una o más hojas y raíces. El número de semillas o plántulas en cada clase se convirtió en un porcentaje del total de 200, y los porcentajes se multiplicaron por un número de clase. Los productos se sumaron y se usaron como índice para representar el crecimiento. La clase (1) no se incluyó en el cálculo de los índices. Al eliminar este porcentaje, se tiene en cuenta la proporción de semillas que no germinaron, de modo que los índices miden el efecto combinado del tratamiento tanto en la germinación como en el crecimiento.

Por lo que se llegó a la siguiente fórmula, la cual fue modificada en esta investigación:

$$ID = \sum_{\chi=1}^{\chi=8} (\epsilon_x / \epsilon) (x) (100)$$

El valor más alto para el índice de desarrollo fue de 680 para *Laelia autumnalis* a los 134 días de cultivo, al tomar en cuenta la composición de medio de cultivo, los medios MS_{50%}, PETERS_{12%} y MS_{12%}, no presentan diferencia estadística entre sí, con un estadio de desarrollo en donde el 80% de las plántulas se encontraban en el estadio 5 (protocormo con una hoja); por lo que se obtuvieron mejores resultados que los reportados por Sierra (2008) quien evaluó la germinación *in vitro* en esta especie en medio MS a diversas exposiciones de luz, el mayor índice de desarrollo a los 130 días de cultivo con un valor de 371.1 (estadio 4, protocormo con rizoides) en luz roja.

La especie que presentó el menor índice de desarrollo fue *Govenia superba* con un valor de 44, a los 134 días después de la siembra.

El medio con el que se obtuvo un mayor desarrollo fue el KM_{12%}, en donde la mayoría de las semillas se encontraban en estadio 1, este resultado muestra que la adición de los compuestos orgánicos para la especie no es favorable, ya que Padrón (2008) obtuvo plántulas de *Govenia capitata* completas en un medio adicionado únicamente con agua de coco alcanzando a los 690 días la formación de planta completa.

Además, es posible que una de las razones por lo que no se consiguió el resultado esperado es que las plántulas de orquídeas terrestres cultivadas *in vitro* tienen altas tasas de mortalidad principalmente en los dos primeros estadios, siendo el primero antes de que el protocormo emerja de la testa de la semilla, y el segundo antes de que emerja la primera raíz en el brote en crecimiento. La muerte temprana de los protocormos se presenta en miembros de todas las subfamilias de orquídeas y puede ser debida a un balance de nutrientes inapropiado, a condiciones de cultivo no adecuadas, a la presencia de luz en semillas sensibles, a la carencia de estimulantes del crecimiento apropiados, temperaturas de incubación extremas o mezclas de gases inadecuadas (Withner & Krieger, 1985).

En el caso de *Bletia neglecta* el valor de ID a los 134 días de cultivo fue de 553, el medio de cultivo más eficiente para esta especie es el medio a base de PETERS_{100%}. No se han encontrado trabajos que registren el desarrollo ontogénico tanto para la especie como para el género, ni el uso de compuestos orgánicos para la germinación *in vitro*. Los resultados obtenidos son importantes pues contribuyen en el conocimiento de las necesidades particulares de la especie, facilitando su micropropagación.

En *Prosthechea cochleata* el índice de desarrollo a los 134 días llegó al estadio 2 como estadio predominante, se obtuvo una mejor respuesta en el medio PETERS_{50%}.

No existen trabajos que contengan información que sustente este resultado, sin embargo, Nadarajan y colaboradores, en el 2011, reportan la germinación en medio KC a diferentes concentraciones con un máximo de $9 \pm 4\%$ en todos los tratamientos, por lo que no llegaron a establecer estadios de desarrollo. Con los presentes resultados se contribuye a la identificación de estadios ontogénicos para la especie.

Formación de PLB's

La obtención de PLB's es uno de los principales objetivos en la micropropagación de orquídeas para obtener plántulas completas idénticas a sus progenitores con un rápido crecimiento. En esta investigación se obtuvieron PLB's en las cuatro especies estudiadas en todos los tratamientos, por lo que se contribuye de manera importante a la investigación básica para la obtención de dichas estructuras.

La aparición y formación de los PLB's se dio principalmente en la superficie del protocormo, entre los 30 y 50 días de cultivo, lo que coincide con Morel (1974), quien al cultivar *in vitro* secciones de protocormos de *Cymbidium* en un medio nutritivo, observó la formación de nuevos protocormos (PLB's) a partir de la región epidérmica (fig. 42).

En esta investigación la composición de los medios de cultivo y las condiciones de incubación influyeron en el desarrollo de PLB's.

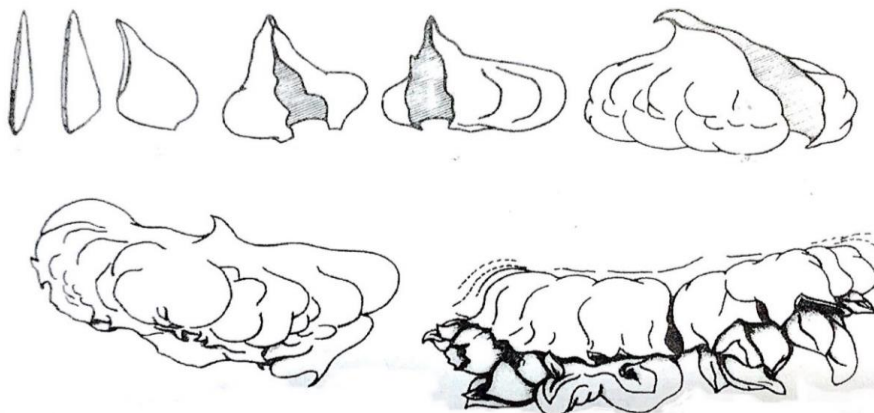


Figura 42. Proceso de formación de PLB's a partir de cortes de protocormo en *Cymbidium* (Morel, 1960).

El efecto del agua de coco en la generación de PLB's puede estar relacionada con su capacidad de inducir divisiones celulares en las células que no lo harían, por lo tanto, promueve la diferenciación temprana del protocormo. Aunado a esto, se ha observado la presencia de reguladores de crecimiento en el agua de coco (por ejemplo, citocinina) que promueven la división y diferenciación celular.

El jugo de piña al contener aminoácidos propicia la división y la proliferación de células embrionarias en plantas *in vitro* por lo que no es necesario la adición de fitohormonas, ya que son sustituidas por los compuestos naturales.

El hecho de agregar estos complejos en conjunto potencializa el efecto inductor de PLB's, sin la necesidad del uso de hormonas sintéticas para obtener resultados semejantes (Kaur & Bhutani, 2012).

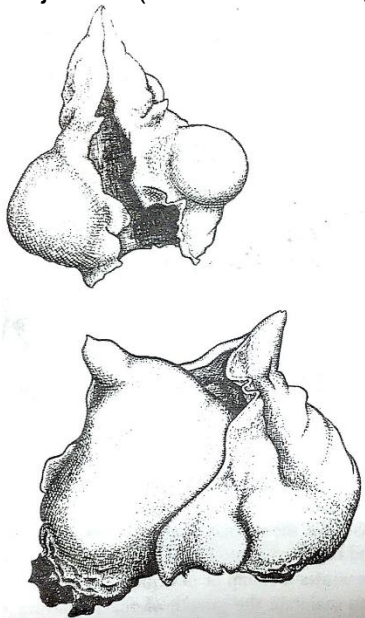


Figura 43. Formación de PLB's a partir de un solo protocormo (Morel, 1960).

De acuerdo con la ruta morfogénica que siguieron dichas estructuras fueron clasificadas en embriogénesis directa o indirecta.

Los PLB's que siguieron por embriogénesis directa no pasaron por una etapa de formación de masa callosa indiferenciada, al igual que lo reportado por Real-Carrasco y colaboradores (2007) y con So Young junto con su equipo (2000) quienes demostraron para híbridos de *Phalaenopsis* que con la utilización de BAP en el medio de cultivo los PLB's siguieron esta misma ruta directa (fig. 43).

Por su parte la formación de masa callosa, y su diferenciación en embriones somáticos, como ruta morfogénica indirecta, es comparable con los resultados obtenidos por Espinosa-Lee y colaboradores (2010) y por Chen & Chang (2006) quienes lograron la inducción de callo con medio MS adicionado con hormonas a partir de embriones somáticos en *Phalaenopsis*.

En el caso de *G. superba* no continuo la formación ni proliferación de masa callosa, al igual que los resultados observados por Kaur & Bhutani (2012) quienes encontraron que altas concentraciones de pulpa de plátano o agua de coco resultan perjudiciales para el desarrollo y sobrevivencia de los PLB's de *Cymbidium pendulum*.

Origen y desarrollo de PLB's de acuerdo al análisis anatómico e histológico

Con base a los cortes histológicos se pudo observar el origen de los PLB's a partir de la epidermis de protocormo al igual que Jheng y colaboradores (2006) que reportaron que para los PLB's de *Oncidium* pueden formarse directamente de la superficie de los inóculos, a través de la diferenciación de las células

epidérmicas. En este caso, es probable que los PLB también tengan un origen de una célula única. Las células subepidérmicas también pueden dar lugar a PLB.

Las células de los PLB's presentaron características típicas, por las que fue fácil su identificación, estos caracteres corresponden con los observados anteriormente, para las células embrionarias que presentan características comunes, presentando un núcleo de tamaño considerable, y vacuolas (Ulisses, Pereira, Silva, Arruda, & Morais, 2016).

La mayor formación de PLB's se dio en la sección basal del protocormo en todas las especies, expandiéndose posteriormente a todas las regiones del mismo, estos resultados se pueden explicar considerando la diferenciación celular y dominancia apical. Hacia el ápice existe una mayor diferenciación celular de los tejidos que conforman al protocormo, puesto que en esta zona se forma el primer meristemo apical del brote (Santiago-Jerónimo et al., 2015). Sin embargo, como se trata de una región de crecimiento activo es probable que no permita la formación de otros centros meristemáticos o de otras yemas laterales. Por otro lado, hacia la base del protocormo el tejido se encuentra menos diferenciado y por lo tanto presenta una mayor capacidad morfogénica (García, Roselló, & Santamarina, 2006).

Resultados similares obtuvo el grupo de Suárez-Quijada (2007) con la regeneración de *Euchile mariae*; ya que, la mayor formación de PLB's se dio a partir de las secciones basales de los protocormos, con un promedio de 11.4 ± 9.64 PLB's por inóculo. Así mismo, José y colaboradores (2011) en *Trichocentrum carthagenense* encontraron que el número de PLB's generados es mayor en la sección basal de los protocormos.

Las observaciones histológicas demuestran que la regeneración de las plántulas ocurrió a través de la formación de PLB's, y que el callo inducido fue embriogénico, lo que coincide con lo obtenido para *Laelia anceps ssp dawsonii* (Espinosa-Lee et al., 2010) en la que se reporta la inducción de callo embriogénico en el medio MS suplementado con ácido naftalénacético (ANA), 6-bencilamino-purina (BAP), cinetina (Kin) y ácido indol acético (AIA), en combinaciones múltiples con la obtención de plantas completas.

Identificación de contenidos celulares

Los depósitos de proteínas fueron predominantes en las células, contrario de los resultados observados por Lee y su equipo (2013) en los que, en los cortes histológicos se encuentran pequeños depósitos de proteínas con apariencia vesicular del citoplasma y la presencia de depósitos de proteínas son eventos transitorios porque reaparecen grandes vacuolas y los depósitos de proteínas desaparecen del citoplasma a medida que avanza el desarrollo; a su vez, menciona que en general, la deposición de almidón comienza primero, seguida de la formación de proteínas de almacenamiento y lípidos.

La concentración de gotas de lípidos distribuidas al azar en la células, lo que corresponde con las observaciones de Ulisses y colaboradores (2016) en las que las gotas de lípidos se encontraban principalmente en la protodermis del embrión pudiendo desempeñar un papel de relativa importancia contra la pérdida excesiva de agua, lo que facilitará la aclimatación de esas plantas, promoviendo la viabilidad y producción de mudas por medio de embriones somáticos primarios y secundarios en el híbrido *Phalaenopsis Classic Spotted Pink*.

La presencia de contenidos celulares mostro la ausencia de almidón en las células analizadas, lo que difiere con lo reportado por Suárez-Quijada y equipo (2007) que al realizar una tinción con lugol a PLB's obtenidos *in vitro* de *Euchile marie* encontró como principal sustancia de reserva almidón, pero a su vez concuerda con lo reportado por Ulisses y colaboradores (2016) en el que al realizar la misma tinción, pero en PLB's obtenidos *in vitro* del híbrido *Phalaenopsis Classic Spotted Pink*, observaron la ausencia de esta biomolécula.

La ausencia de almidón probablemente está asociada al estadio juvenil en los embriones. El almidón es considerado como el principal carbohidrato de reserva en las plantas, actuando como fuente de energía para las alteraciones metabólicas en plantas o suministrando moléculas de azúcares para biosíntesis de lípidos, proteínas, antioxidantes y polisacáridos (Pescador, Kerbauy, Viviani, & Kraus, 2008; Ulisses et al., 2016).

Conclusiones

- Se establecieron los protocolos para la germinación *in vitro* de *Laelia autumnalis*, *Bletia neglecta* y *Prosthechea cochleata*, los cuales contribuirán en su conservación y aprovechamiento. No fue posible establecer un protocolo para *Govenia superba*, ya que los medios probados no fueron los adecuados para esta especie, por lo que es necesario continuar su estudio.
- Para la germinación *in vitro* de *L. autumnalis* el medio de cultivo más adecuado fue el PETER'S 50%
- El medio de cultivo KM_{12%} es el más apropiado para la germinación de *P. cochleata* y *G. superba*.
- Para las semillas de *B. neglecta* el medio PETERS_{100%} cumple con los requerimientos nutricionales para su germinación.
- La utilización de los medios PETERS y KM_{12%} como medios alternativos para la propagación *in vitro* de orquídeas, es un hallazgo importante pues representa disminuir los costos de producción.
- Cada especie presenta requerimientos especiales para su micropropagación, sin tomar en cuenta su hábito de crecimiento.
- La combinación de complejos orgánicos (agua de coco y jugo de piña) es una alternativa en la germinación de las especies estudiadas, promoviendo la formación de PLB's, que permiten la generación de plántulas completas a partir de una sola semilla. La combinación de agua de coco y jugo de piña no había sido probada, por lo que representa un aporte más de este estudio.
- La formación de PLB's a partir de protocormos se dio en las cuatro especies sin la necesidad del uso de reguladores de crecimiento vegetal
- Los PLB's se originan a partir de dos rutas morogénicas (directa e indirecta)
- Los PLB's se desarrollan hasta plántulas completas en *B. neglecta* y *L. autumnalis*
- El almacenamiento en condiciones adecuadas (temperatura y humedad) de las semillas de las especies utilizadas mantiene su viabilidad, arriba de 70%, por periodos largos de tiempo (5 a 13 años).
- Se están aportando los primeros estudios anatómicos e histológicos de las especies estudiadas, iniciando de esta manera los estudios sobre su biología básica.
- Se identificaron y establecieron 9 estadios ontogénicos para la germinación de las cuatro especies estudiadas.
- Se proponen tres paquetes tecnológicos para la micropropagación de *Laelia autumnalis*, *Bletia neglecta* y *Prosthechea cochleata*.

Bibliografía

- Alcaraz-Ariza, F. J., & García-Serrano, J. A. (2005). Las Orquídeas silvestres de Jumilla-Yecla, 16.
- Aqeel, R., Zehra, M., Kazmi, S. K., Khan, S., Kayani, H. A., & Mirbahar, A. A. (2016). A study on the isolation of protoplasts from mesophyll cells of *Dendrobium* Queen pink. *Pakistan Journal of Botany*, 48(2), 693–697.
- Arditti, J. (1992). *Fundamental of Orchid Biology*. California: John Wiley and Sons.
- Arditti, J. (2008). *Micropropagation od orchids* (2nd ed.). Blackwell.
- Arditti, J., & Ghani, A. K. A. (2000). Tansley Review No. 110: Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist*, 145(3), 367–421. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00587.x>
- Barba, A. A., Luna, R. S., & Romero, A. J. (2002). *Orquideología Básica. Biotemas*. México: U.I.B.V.FES.Zaragoza.
- Barthlott, W., Große-Veldmann, B., & Korotkova, N. (2014). Orchid seed diversity: a scanning electron microscopy survey. *Englera*, 32, 245.
- Batygina, T. B., Bragina, E. A., & Vasilyeva, V. E. (2003). *The reproductive system and germination in orchids. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*.
- Cámara Hurtado, M. (1992). *Caractrización de derivados de piña: zumos y nectares*. Universidad Complutense de Madrid.
- Caplin, S. M., & Steward, F. C. (1948). Effect of coconut milk on the growth of explants from carrot root. *Science*, 108, 655–657.
- Catálogo Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/mexico.html>. Fecha de consulta: 20 de marzo de 2017.
- Chen, J. ., & Chang, W. . (2006). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. *Biología Plantarum*, 50(2), 169–173. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)80144-6](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80144-6)
- Chugh, S., Guha, S., & Rao, I. U. (2009). Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*, 122(4), 507–520. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.07.016>
- Correa, I. C. C., & Andrade, S. S. (2008). *Micropropagación De Cattleya Quadricolor. PROYECTOS DE GRADO 2008 Artículos*.
- Cruz Aguilar, M., Melgarejo, L. M., & Romero, M. (2006). *Fisiología y bioquímica vegetal*. Colombia.
- Damon, A., Guerrero, A., Rivera, L., & Nikolaeva, V. (2004). Germinación in vitro de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México. *Chapingo Serie Horticultura*, 10(195–203).

- Duarte Salinas, I. I. (2014). *Germinación in vitro de Barkeria uniflora LEX. DRESSLER & HALBINGER, una orquídea endémica de México*. FES Zaragoza, UNAM.
- Echenique, V., Hopp, E., Levitus, G., Mroginski, L., & Rubinstein, C. (2010). *Biotechnología y Mejoramiento Vegetal II. Ediciones INTA*.
- Epstein, E. (1971). Mineral Nutrition of Plants. Principles and Perspectives. *John Wiley and Sons Inc*, 19–34.
- Espejo-Serna A., García-Cruz J., López-Ferrari A. R., J. M. R. & S. S. L. (2002). Orquídeas del Estado de Morelos. México: Herbario AMO y UAM-Iztapalapa.
- Espinosa-Lee, H. E., Cerda-Laguna, A., González-Murguía, O., Iglesias-Andreu, L., Rosas-García, B., López-Escobedo, D., ... Santana-Buzzy, N. (2010). Un protocolo de embriogénesis somática para la regeneración y caracterización in vitro de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33(4), 323–332.
- Fitotec: <https://fitotecz.blogspot.mx/>. Fecha de consulta: 13 de febrero del 2018.
- Flores, G., Legaria, P., Vásquez, G., & Colinas, M. (2008). Propagación in vitro de *Oncidium stramineum* lindl. Una orquídea amenazada y endémica de México. *Chapingo Serie Horticultura*, 14, 347–353.
- Fox, J. ., & Miller, C. (1959). Factors in corn steep water promoting growth of plant tissues. *Plant Physiol*, 34, 577–579.
- García, F., Roselló, J., & Santamarina, M. (2006). *Introducción al Funcionamiento de las Plantas*. España: Universidad Politécnica Valencia.
- García, J. A., Valerín, A. T., & Salazar, R. (1993). Utilización de tres medios orgánicos para la germinación in vitro de semillas de *Guaria Morada*, *Cattleya skinneri* (Bateman). *Uniciencia*, 1, 79–83.
- Gautheret, R. J. (1948). Sur la culture indéfinie des tissus de *Salix caprea*. *Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie*, 142, 807.
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G.-J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture Volume 1. The Background* (3rd Editio). Netherlands: Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3>
- George, E., Hall, M., & De Klerk, G.-J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture* (3rd ed.). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3>
- Gonzalez, L. de A. (2014). *Propagación in vitro de Laelia speciosa (Orchidaceae) nativa de Aguascalientes*. Universidad Autonoma de Aguscalientes.
- Guha, S., & Maheshwari, S. C. (1967). Development of embryoids from pollen grains of *Datura* in vitro. *Phytomorph*, 17, 454–461.
- Haberlandt, G. (1902). Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzundber Akad Wiss Wien. *Math Naturwiss K1 Abt*, 1(111), 69–92.

- Hágsater, E., M. A., Soto-Arenas, G. A., Salazar Chávez, J., Jiménez Macorro, M. A. López Rosas, Y., & Dressler, R. . (2005). *Las orquídeas de México*. México: Instituto Chinoín.
- Hágsater, E., Soto-Arenas, G. A., Salazar-Chávez, J., Jiménez-Macorro, R., López, M. A., & Dressler, R. . (2005). *Las orquídeas de México*. México: Instituto Chinoín.
- Halbinger, F., & Soto, M. (1997). Laelias of México; Orquídea (Méx.). *Revista Del Herbario AMO*, (15), 104–108.
- Hurtado, M. ., & Merino, M. E. (1987). *Cultivo de tejidos vegetales*. México: Trillas.
- Jheng, F. Y., Do, Y. Y., Liauh, Y. W., Chung, J. P., & Huang, P. L. (2006). Enhancement of growth and regeneration efficiency from embryogenic callus cultures of *Oncidium* “Gower Ramsey” by adjusting carbohydrate sources. *Plant Science*, 170, 1133 – 1140.
- José, J., Nava, F., Jiménez-aparicio, A. R., Jesús-sánchez, A. De, Arenas-ocampo, M. L., Ventura-zapata, E., & Evangelista-lozano, S. (2011). Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de *Laelia eeyermaniana* RCHB. f. generadas in vitro. *Polibotánica*, 32, 107–117.
- Kao, K. N., & Michailuk, M. R. (1975). Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cell and protoplasts at a very low population density in liquid medium. *Planta*, 126, 105–110.
- Kaur, S., & Bhutani, K. (2012). Organic growth supplement stimulants for in vitro multiplication of *Cymbidium pendulum* (Roxb.). *Hort. Sci.*, 39, 47–52.
- Knudson, L. (1952). Nutrient solutions for orchid seed germination. *American Orchid Society*, 21(1), 94.
- Krikorian, A., & Berquam, D. (1969). Plant cell and tissue cultures: the role of Haberlandt. *Bot Rev*, 35, 59–88.
- Kuraishi, S., & Okumura, F. . (1961). A new green-leaf growth stimulating factor, phyllococcosine, from coconut milk. *Nature*, 189, 148–149.
- Laimer, M., & Ucker, W. (2003). *Plant tissue culture, 100 years since Gottlieb Haberlandt*. Vienna: Springer.
- Lee-Espinosa, H., Laguana-Cerda, A., Murgía-González, J., Elorza-Martínez, P., Iglesias-Andreu, L., García-Rosas, B. B.-P. F. A., & Santana-Buzzy, N. (2007). Regeneración in vitro de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*. *Revista UDO Agrícola*, 7(1), 58–67.
- Lee, Y. I., Hsu, S. Te, & Yeung, E. C. (2013). Orchid protocorm-like bodies are somatic embryos. *American Journal of Botany*, 100(11), 2121–2131. <https://doi.org/10.3732/ajb.1300193>
- Luna, B. S. (2016). *Bioguías: orquídeas del parque nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl y áreas de influencia*. México: Unidad de Investigación en

Biología Vegetal, UNAM.

- Luna Rosales, B. S. (2016). *BIOGUÍAS: ORQUÍDEAS DEL PARQUE NACIONAL IZTACÍHUATL-POPOCATÉPETL Y ÁREAS DE INFLUENCIA*. México: Unidad de Investigación en Biología Vegetal, UNAM.
- McKendrick, S. (2000). *Manual para la germinación in vitro de orquídeas*. Ceiba Foundation for Tropical Conservation.
- Morel, G. M. (1960). Producing virus free Cymbidiums. *Amer. Orch. Soc. Bull.*, 29(7), 495–497.
- Morel, G. M. (1974). *Clonal multiplication of orchids. The orchids. Scientific studies*. (Wiley-Inte). USA: Withner, C. L. (ed.).
- Muñoz Barrionuevo, M. (2011). *Evaluación de medios de cultivo para la germinación "in vitro" de las orquídeas *Cyrtorchilum macranthum* y *Epidendrum jameisonic* Rchb. F.* Universidad Técnica de Ambato. Ecuador.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiology*, 15, 437–497.
- Nadarajan, J., Wood, S., Marks, T. R., Seaton, P. T., & Pritchard, H. W. (2011). Nutritional requirements for in vitro seed germination of 12 terrestrial, lithophytic and epiphytic orchids. *Journal of Tropical Forest Science*, 23(2), 204–212.
- Navarro, M., & By-nc-, C. C. (2009). Índice Distribución y hábitat *Govenia* superva. *Catálogo Taxonómico de Especies de México, In Capital*, 4.
- Ng, C. Y., & Mohd Saleh, N. (2011). In vitro propagation of Paphiopedilum orchid through formation of protocorm-like bodies. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 105(2), 193–202. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9851-0>
- Obaidul, M. I., Matsui, S., & Ichihashi, S. (2000). Effects of complex organic additives on seed germination and carotenoid content in *Cattleya* seedlings. *Lindleyana*, 15(2), 81–88.
- Ortega-Larrocea, M. P., Martínez-Palacios, A., & Chávez-Aviña, V. M. (2007). Conservación y propagación de orquídeas. *Revista UNAM*, 483–495.
- Padrón Hernández, S. (2006). *Germinación asimbiótica in vitro de *Govenia capitata**. FES Zaragoza, UNAM.
- Pedraza-Santos, M. E. (2017). La propagación masiva de orquídeas (Orchidaceae); una alternativa de conservación de especies silvestres. *Agroproductividad*, 10(6), 31–36. <https://doi.org/10.1174/113839597322011906>
- Pérez, F. (2014). Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. *Igarss 2014*, (1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Pescador, R., Kerbauy, G., Viviani, D., & Kraus, J. (2008). Anomalous somatic

- embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae). *Rev Bras Bot.*, 31(1), 155–164.
- Peters Professional® 24-8-16 Foliage Special. (2015).
- Ranga Swamy, N. S. (1958). Culture of nucellar tissue of Citrus in vitro. *Experientia*, 14, 111–112.
- Rasmussen, H. N., Dixon, K. W., Jersáková, J., & Těšitelová, T. (2015). Germination and seedling establishment in orchids: A complex of requirements. *Annals of Botany*, 116(3), 391–402. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv087>
- Real-Carrasco, S., Martínez-Moreno, D., & Menchaca-García, R. A. (2007). Cultivo de protocormos de *Mormodes maculata* var. *unicolor* L.O. WILLIAMS (ORCHIDACEAE). *Foresta Veracruzana*, 9(1), 55–59.
- Rodríguez Farfán, A. B. (2013). *Inducción de la germinación in vitro de Epidendrum radicans Pav. ex Lindl.* Universidad Nacional Autónoma de México.
- Romero-Tirado, R., Luna-Rosales, B. S., & Barba-Álvarez, A. (2007). Uso de complejos comerciales como sustitutos del medio de cultivo en la propagación de in vitro de *Laelia anceps*. *Lankesteriana*, 7(1–2), 353–356.
- Romero-Tirado, R., Luna, B. S., & Barba, A. (2007). Uso de complejos comerciales como sustitutos del medio de cultivo en la propagación de in vitro de *Laelia anceps*. *Lankesteriana*, 7(1–2), 353–356.
- Romero, J. (1990). *Cultivo in vitro de tres especies de palma Camedor.* Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ruíz, B., Laguna, C., Iglesias, A., Damon, A., Marín, H. Azpíroz, R. (2008). In vitro germination of *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae) seeds. *Python Revista*, 77, 203–215.
- Ruiz, M. de los Á. (2009). *El análisis de tetrazolio en el control de calidad de semillas. Caso de estudio: cebadilla chaqueña. Publicación Técnica* (Vol. 77). <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2015.2160>
- Sagawa, Y. (1991). Clonal Propagation of Orchids. *Plant Tissue Culture Manual*, 1, 1–7.
- Salazar-Mercado, S. A., Amaya-Nieto, A., & Barrientos-Rey, F. (2013). Evaluación de diferentes medios de cultivo in vitro en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 97–105.
- Salazar, M. S. A., Amaya, N. A. Z., & Barrientos, R. F. I. (2013). Evaluación de diferentes medios de cultivo in vitro en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, XV(2), 98–103.

- Salazar, S. (2012). Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo in vitro de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombroin (Orchidaceae). *Revista Acta Agronómica*, 61, 69–78.
- Sandoval, E. (2005). *Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal*. (F. Chiang Cabrera, Ed.) (Primera Ed). México, D.F.: Cuadernos 38.
- Santiago-Jerónimo, T., Carballar-Hernández, S., & Chávez-Ávila, V. M. (2015). Germinación y regeneración in vitro de *Epidendrum falcatum* LINDL. In *Ciencias de la Biología y Agronomía* (pp. 151–160). México.
- Seaton, P., & Ramsay, M. (2015). *Growing orchids from seeds*. Royal Botanical Garden Kew. London, England.
- Sharry, S., Adema, M., & Abedini, W. (2015). *Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas*. Retrieved from <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/46738>
- Sharry, S. E., Adema, M., & Abedini, W. (2015). *Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas*.
- Sharry, S. y A. W. (2015). Un poco de historia. In *Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro* (Facultad d, pp. 13–21). Argentina: Universidad de la Plata.
- So Young, P., Murthy, H. N., & Kee Yoeup, P. (2000). Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63(1), 67–72. <https://doi.org/10.1023/A:1006420116883>
- Soto, M., & Salazar, A. (2008). Orquídeas. *Biodiversidad de Oaxaca*, 271–295.
- Spoerl, E. (1948). Amino Acids as Sources of Nitrogen for Orchid Embryos . *American Journal of Botany*, 35(2), 88–95. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/2437891>
- Steward, F. C., & Shantz, E. M. (1956). The chemical induction of growth in plant tissue cultures. *Wain and Wightman*, 165–186.
- Suárez-Quijada, I., Hernández-Altamirano, M., Chávez-Ávila, V. M., Sandoval-Zapotitla, E., & Martínez-Palacios, A. (2007). Propagación in vitro y aclimatización de *Euchile Marie* (AMES) WITHNER (Orchidaceae). *Lankesteriana*, 7(1–2), 388–393.
- Suárez-Quijada, I., Sandoval-Zapotitla, E., Hernández-Altamirano, M., & Chávez-Ávila, V. M. (2007). Determinación histológica de regenerantes de *Euchile marie* (AMES) WITHNER, (orchidaceae), obtenidos a partir de protocormos cultivados in vitro. *Lankesteriana*, 7(1–2), 94–397.
- Ulisses, C., Pereira, J. A. F., Silva, S. S., Arruda, E., & Morais, M. (2016). Indução e histologia de embriões somáticos primários e secundários do híbrido *Phalaenopsis Classic Spotted Pink* (Orchidaceae). *Acta Biológica*

Colombiana, 21(3), 571. <https://doi.org/10.15446/abc.v21n3.50032>

Van Ovenbeek, J. (1942). Water uptake by excised root systems of the tomato due to non-osmotic forces. *Am. J. Bot.*, 29, 677–683.

Vergara-Galicia, J., Aguirre-Crespo, F., Castillo-España, P., Arroyo-Mora, A., Lopez-Escamilla, A. L., Villalobos-Molina, R., & Estrada-Soto, S. (2010). Micropropagation and vasorelaxant activity of *Laelia autumnalis* (Orchidaceae). *Natural Product Research*, 24(2), 106–114. <https://doi.org/10.1080/14786410802340820>

Victoria T., J. A., Bonilla C., C. R., & Sánchez O., M. S. (2006). Viabilidad en tetrazolio de semillas de caléndula y eneldo. *Acta Agronómica*, 55(1), 1–15. <https://doi.org/10.5944/educxx1.17.1.10708>

Withner, C. L., & Krieger, R. E. (1985). *Orchi, The Studies., ds. Scientific*. Florida: Publishing Company.

Yam, T. W., & Arditti, J. (2009). History of orchid propagation: A mirror of the history of biotechnology. *Plant Biotechnology Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11816-008-0066-3>

ANEXOS

Anexo I

Cuadro 7. Composición de los medios de cultivo Kao & Mychayluk (KM) y Murashige & Skoog (MS)

Sales inorgánicas	KM	MS
	mgL ⁻¹	mgL ⁻¹
Macronutrientes		
MgSO ₄	146.6	870
NH ₄ NO ₃	600	-
KH ₂ PO ₄	170	170
KNO ₃	190	1900
CaCl ₂ 2H ₂ O	453	440
(NH ₆) NO ₃		1650
KCl	300	
Micronutrientes		
ZnSO ₄ 7H ₂ O	2	8.6
H ₃ BO ₃	3	6.2
MnSO ₄ H ₂ O	10	22.3
Na ₂ Mo ₄ 2H ₂ O	0.25	0.25
KI	0.75	-
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.25	0.025
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025	0.025
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	37.3	87.8
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.8	27.8

Composición fertilizante comercial Peter's® 24-8-16

Nitrógeno total (N)	25%
Nitrato de nitrógeno (N-NO ₃)	8.7%
Amonio de nitrógeno (N-NH ₄)	7.7%
Urea nitrogenada (Ur-N)	8.2%
Fosfato disponible (P ₂ O ₅)	8%
Potasio soluble (K ₂ O)	16%
Magnesio (Mg)	0.4%
Sulfuro (S)	2.0%
Fierro (Fe)	0.06%
Quelato de EDTA	0.06%
Manganeso (Mn)	0.03%
Quelato de EDTA	0.03%
Boro (B)	0.02%
Cobre (Cu)	0.015%
Quelato de EDTA	0.015%
Molibdeno (Mo)	0.006%
Zinc (Zn)	0.030%
Quelato de EDTA	0.030%

("Peters Professional® 24-8-16 Foliage Special," 2015)

Fitohormonas

Auxina Zeatina ribosida
Giberilina
1,3-difenil urea Citocininas
 desconocidas
Zeatina
Glucósido de
Zeatina
(Padrón Hernández,
2006)

Sustancias identificadas en el jugo de piña

Aminoácidos

Alanina	Histidina	Tirosina
Arginina	Isoleucina	Treonina
Cistina	Leucina	Triptofano
Fenilalanina	Lisina	Valina
Glicina	Metionina	

Ácidos orgánicos

ácido aspártico
ácido glutámico

Azucares

Fructosa
Glucosa
Sacarosa

Vitaminas

- A
- B1
- B2
- B3
- B5
- B6
- B7
- B9
- B12
- C
- D
- E
- K

Fitohormonas

No identificadas (Cámara Hurtado, 1992)

Anexo III

Distribución normal para el índice de desarrollo

Laelia autumnalis

Se muestra una serie de resultados en donde, de acuerdo a la prueba de Shapiro-Wilk, se distribuyen de manera normal (fig 44.).

Dado que el valor de P es mayor que 0.05 (cuadro 8) no es posible rechazar la idea de que le ID se distribuya normalmente con un intervalo de confianza del 95%.

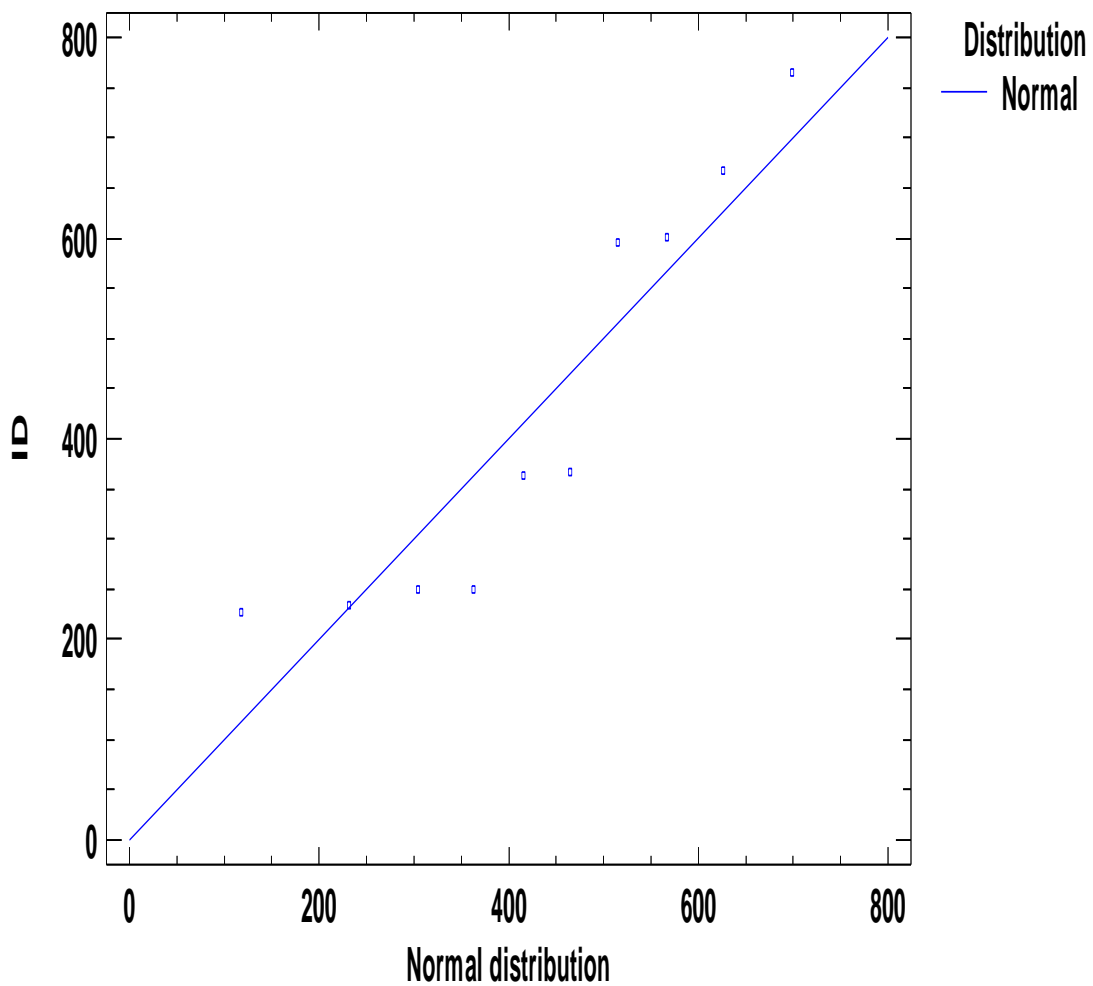


Figura 44. Gráfica de distribución normal del ID para *L. autumnalis*.

Cuadro 8. Prueba de normalidad para ID de *L. autumnalis*.

Prueba	Estadística	Valor de P
Shapiro-Wilk W	0.867655	0.0714942

Bletia neglecta

Se muestra una serie de resultados en donde, de acuerdo a la prueba de Shapiro-Wilk, se distribuyen de manera normal (fig 45).

Dado que el valor de P es mayor que 0.05 (cuadro 9) no es posible rechazar la idea de que le ID se distribuya normalmente con un intervalo de confianza del 95%.

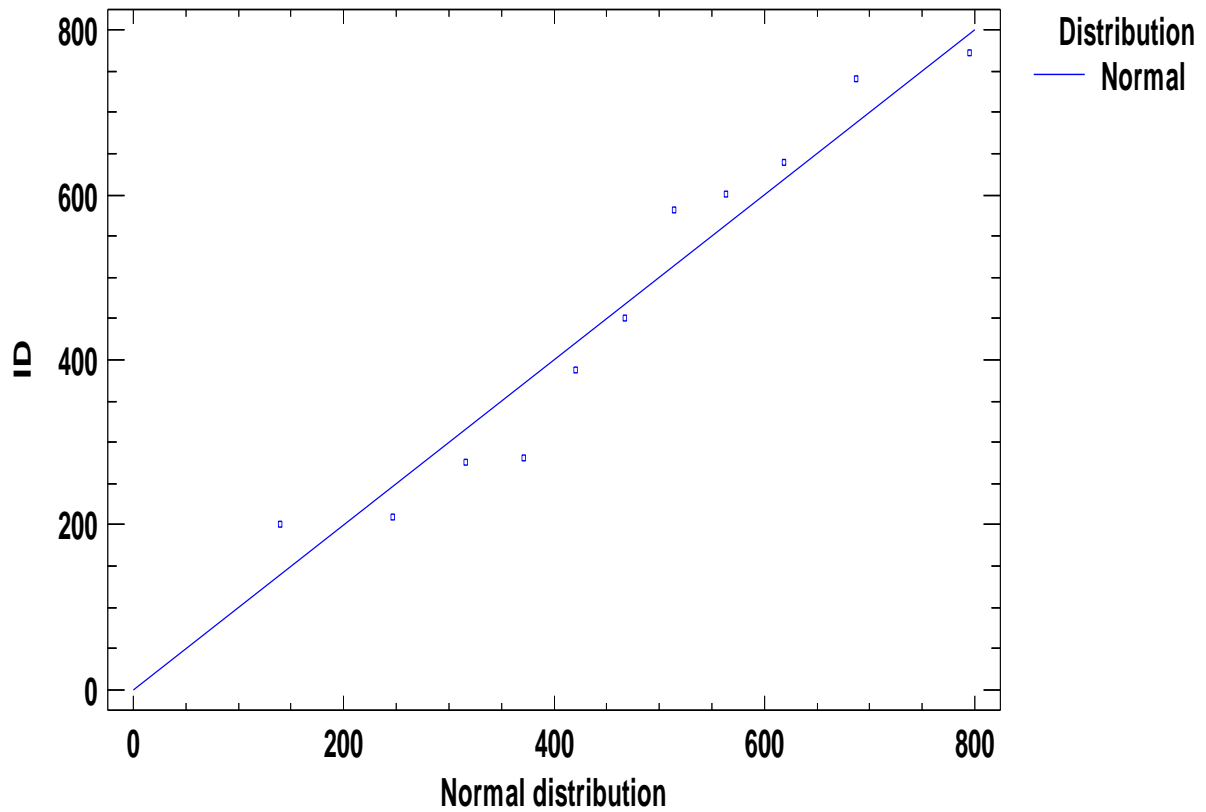


Figura 45. Gráfica de distribución normal del ID para *B. neglecta*.

Cuadro 9. Prueba de normalidad para ID de *B. neglecta*.

<i>Prueba</i>	<i>Estadística</i>	<i>Valor de P</i>
Shapiro-Wilk W	0.921836	0.318773

Prosthechea cochleata

Se muestra una serie de resultados en donde, de acuerdo a la prueba de Shapiro-Wilk, se distribuyen de manera normal (fig 46).

Dado que el valor de P es mayor que 0.05 (cuadro 10) no es posible rechazar la idea de que le ID se distribuya normalmente con un intervalo de confianza del 95%.

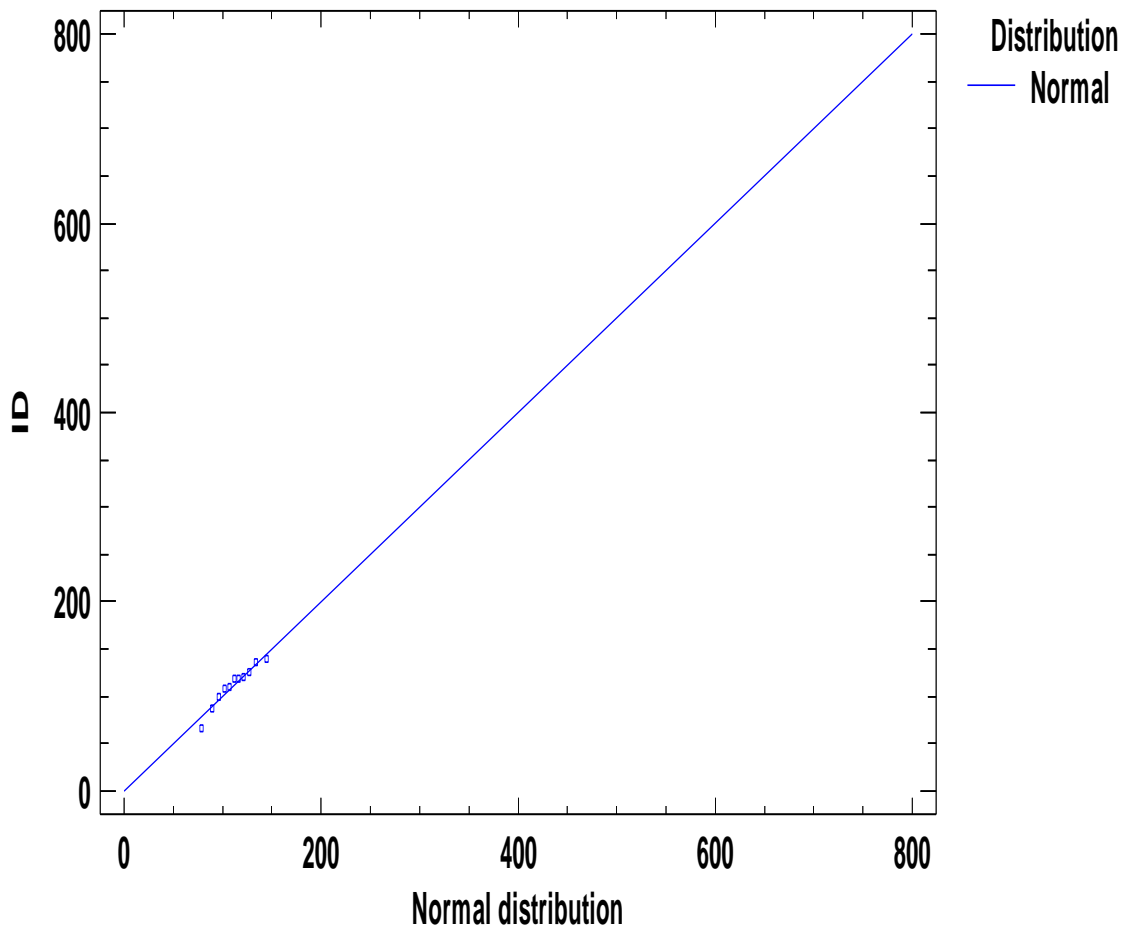


Figura 46. Gráfica de distribución normal del ID para *P. cochleata*

Cuadro 10. Prueba de normalidad para ID *P. cochleata*.

<i>Prueba</i>	<i>Estadística</i>	<i>Valor de P</i>
Shapiro-Wilk W	0.93782	0.474287

Govenia superba

Se muestra una serie de resultados en donde, de acuerdo a la prueba de Shapiro-Wilk, se distribuyen de manera normal (fig 47).

Dado que el valor de P es mayor que 0.05 (cuadro 11) no es posible rechazar la idea de que le ID se distribuya normalmente con un intervalo de confianza del 95%.

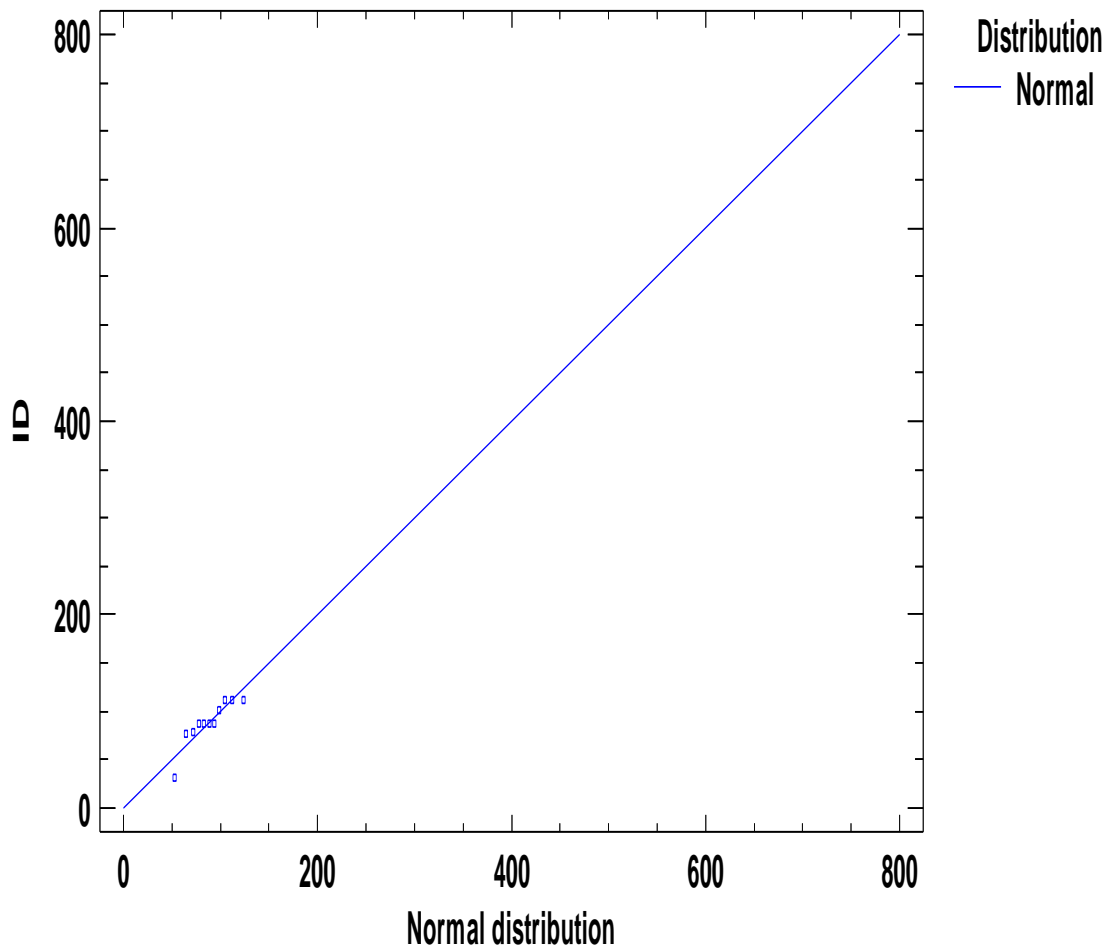


Figura 47. Gráfica de distribución normal del ID para *G. superba*

Cuadro 11. Prueba de normalidad para ID de *G. superba*.

Prueba	Estadística	Valor de P
Shapiro-Wilk W	0.817498	0.073079

Anexo IV

Índice de desarrollo

Cuadro 12. Análisis de varianza para el Índice de desarrollo de *Autumnalis*

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-Radio	Valor de P
A: Tiempo (días)	2.25183E6	10	225183.	44.51	0.0000
B: Tratamiento	857746.	6	142958.	28.26	0.0000
RESIDUAL	303529.	60	5058.82		
TOTAL	3.4131E6	76			

Cuadro 13. Prueba de rangos múltiples para índice de desarrollo con respecto a tiempo (días) para *autumnalis*.

Método 95%LSD

Tiempo (días)	Cuenta	LS medias	LS Sigma	Grupos Homogéneos
30	7	155.35	26.8829	Xe
37	7	181.42	26.8829	Xe
44	7	220.21	26.8829	Xe
51	7	220.92	26.8829	Xe
56	7	324.10	26.8829	X
63	7	360.71	26.8829	Xd
70	7	458.92	26.8829	X
78	7	488.75	26.8829	X
85	7	521.25	26.8829	Xc
106	7	602.14	26.8829	Xb
134	7	680.35	26.8829	Xa

Cuadro 14. Prueba de rangos múltiples para Índice de desarrollo con respecto al tratamiento para *autumnalis*

Método 95%LSD

Tiempo (días)	Cuenta	LS medias	LS Sigma	Grupos Homogéneos
KM 12%+ JP+ AC	11	210.04	21.4451	X
PETERS 100%	11	277.27	21.4451	X
KM 50%+ JP+ AC	11	308.86	21.4451	X
PETERS 50%+ JP+ AC	11	465.11	21.4451	X
PETERS 12%+ JP+AC	11	467.159	21.4451	X
MS 12%+ JP+ AC	11	473.182	21.4451	X
MS 50%+ JP+ AC	11	480.114	21.4451	X

Cuadro 15. Análisis de varianza para el índice de desarrollo de *B. neglecta*

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-Radio	Valor de P
A: Tiempo (días)	1.23335E6	10	123335.	13.44	0.0000
B: Tratamiento	203807.	6	33967.8	3.70	0.0034
RESIDUAL	550690.	60	9178.17		
TOTAL	1.98784E6	76			

Cuadro 16. Prueba de rangos múltiples para índice de desarrollo con respecto al tiempo (días) para *B. neglecta*.

Método 95%LSD

Tiempo (días)	Cuenta	LS medias	LS Sigma	Grupos Homogéneos
30	7	81.1814	36.21	Xe
37	7	95.5	36.21	XXed
44	7	105.179	36.21	XXX
51	7	127.071	36.21	XXX
56	7	129.821	36.21	XXX
63	7	166.393	36.21	XXXedc
70	7	178.286	36.21	XXXedcb
78	7	184.071	36.21	XXXdcb
85	7	200.143	36.21	XXcb
106	7	280.607	36.21	Xb
134	7	552.786	36.21	Xa

Cuadro 17. Índice de desarrollo de *B. neglecta* en tratamientos alternativos independientemente a los días de cultivo.

Método 95%LSD

Tratamiento	Cuenta	LS medias	LS Sigma	Grupos homogéneos
KM 12%+ JP+ AC	11	150.979	28.8856	X
PETERS 12%+ JP+AC	11	156.591	28.8856	X
PETERS 50%+ JP+ AC	11	162.409	28.8856	X
KM 50%+ JP+ AC	11	170.25	28.8856	X
MS 50%+ JP+ AC	11	185.409	28.8856	X
MS 12%+ JP+ AC	11	200.5	28.8856	X
PETERS 100%	11	310.886	28.8856	X

Cuadro 18. Análisis de varianza para el índice de desarrollo de *P. cochleata*.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-Radio	Valor de P
A: Tiempo (días)	162815.	10	16281.5	15.10	0.0000
B: Tratamiento	20332.5	6	3388.75	3.14	0.0096
RESIDUAL	64692.2	60	1078.2		
TOTAL	247840.	76			

Cuadro 19. Índice de desarrollo de *P. cochleata* considerando el tiempo del cultivo, independientemente de los tratamientos empleados.

Método 95%LSD

Tiempo (días)	Cuenta	LS medias	LS Sigma	Grupos Homogéneos
30	7	13.8286	12.4108	Xg
37	7	76.0714	12.4108	Xf
44	7	97.5357	12.4108	XXef
51	7	106.75	12.4108	XXX
56	7	109.536	12.4108	XXXcde
63	7	121.393	12.4108	XX
70	7	123.071	12.4108	XX
78	7	125.321	12.4108	XXcd
85	7	135.143	12.4108	XXbc
106	7	169.607	12.4108	XXab
134	7	201.75	12.4108	Xa

Cuadro 20. Índice de desarrollo de *P. cochleata* en tratamientos alternativos independientemente a los días de cultivo.

Tratamiento	Cuenta	LS medias	LS Sigma	Grupos homogéneos
PETERS 100%	11	89.4545	9.90043	X
MS 12%+ JP+ AC	11	105.273	9.90043	XX
MS 50%+ JP+ AC	11	107.477	9.90043	XX
KM 12%+ JP+ AC	11	111.823	9.90043	XXX
KM 50%+ JP+ AC	11	130.705	9.90043	XX
PETERS 12%+ JP+AC	11	132.886	9.90043	XX
PETERS 50%+ JP+ AC	11	136.932	9.90043	X

Cuadro 21. Análisis de varianza del índice de desarrollo para *G. superba*.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-Radio	Valor de P
A: Tiempo (días)	5580.9	10	558.09	5.67	0.0000
Tratamiento	45816.1	6	7636.01	77.52	0.0000
RESIDUAL	5909.95	60	98.4992		
TOTAL	57306.9	76			

Cuadro 22. Índice de desarrollo de *G. superba* considerando el tiempo del cultivo, independientemente de los tratamientos empleados.

Método 95%LSD

<i>Tiempo (días)</i>	<i>Cuenta</i>	<i>LS medias</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
30	7	17.2143	3.75117	X
37	7	23.9286	3.75117	Xb
44	7	39.1786	3.75117	X
56	7	40.6429	3.75117	X
51	7	40.6429	3.75117	X
63	7	40.75	3.75117	X
70	7	40.75	3.75117	X
78	7	42.7143	3.75117	X
85	7	44.1786	3.75117	X
106	7	44.1786	3.75117	X
134	7	44.1786	3.75117	Xa

Cuadro 23. Índice de desarrollo de *G. superba* en tratamientos alternativos independientemente a los días de cultivo.

Método 95%LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Cuenta</i>	<i>LS medias</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
KM 50%+ JP+ AC	11	10.0	3.41388	Xd
MS 12%+ JP+ AC	11	10.1818	3.41388	Xd
MS 50%+ JP+ AC	11	32.2955	3.41388	Xc
PETERS 50%+ JP+ AC	11	40.9091	3.41388	XXbc
PETERS 100%	11	42.0455	3.41388	X
PETERS 12%+ JP+AC	11	42.5	3.41388	Xb
KM 12%+ JP+ AC	11	88.2955	3.41388	Xa

Anexo V

Análisis de costos de tratamientos utilizados

Cuadro 24. Costos por componente para medio de cultivo.

Componente	Precio total (pesos)	Costo por litro (pesos)
Sales basales Murashige & Skoog (MS)	828.00	82.80
Sales basales Kao & Mychayluk (KM)	465.00	9.30
Sacarosa	1,603.00	48.00
Peters	100.00	0.50
Piridoxina	1,445.00	0.28
Tiamina	112.00	0.02
Niacina	576.00	28.80
Carbon activado	342.00	0.27
Myoinositol	1,687.00	168.70
Agar gel	8,014.00	48.00
Agua de coco	10.00	3.33
Jugo de piña	17.60	1.76
Azúcar refinada	19.00	0.57
Kinetina	1,329.00	6.70
BAP	763.00	3.80

Cuadro 25. Costo de tratamiento por litro y comparación de un tratamiento con el uso de hormonas comerciales.

Tratamiento	Costo por litro (pesos)
MS _{100%} +AC+JP	341.23
KM _{100%} +AC+JP	260.46
PETERS _{100%}	252.23
MS con hormonas	387.37

*Costos tomados del catálogo Sigma-Aldrich sin IVA ni gastos de envío. (<https://www.sigmaaldrich.com/mexico.html>)

PAQUETE TECNOLÓGICO

Paquete tecnológico para el cultivo *in vitro* de *Laelia autumnalis*

Material biológico: semillas maduras de *L. autumnalis*

- 1. Desinfestación:** colocar de aproximadamente 200 semillas en sobres de papel filtro. Sujetar cada sobre con un clip metálico. Sumergir los sobres en agua destilada para extraer el aire. Transferirlos a una solución de etanol a 70% (v/v) durante 5 minutos. Dentro de la campana de flujo laminar, colocarlos en una solución de NaOCl al 10% (v/v) por 10 minutos, aplicando agitación constante. Realizar tres enjuagues con agua destilada estéril. Colocar los sobres dentro de una caja Petri hasta el momento de la siembra.
- 2. Siembra in vitro:** Dentro de la campana de flujo laminar, con ayuda de pinzas de disección, transferir cada sobre a otra caja Petri y retirar el clip, abrir cuidadosamente de manera que las semillas queden expuestas. Extender el papel con las semillas sobre el medio de cultivo, PETERS_{50%} adicionado con agua de coco y jugo de piña (10% v/v).
- 3. Condiciones de incubación:** Los cultivos permanecerán en el cuarto de incubación con una intensidad luminosa de 4670 lux, a una temperatura de 25° C +/- 2° y fotoperiodo de 16/8.
- 4. Desarrollo:** La germinación para *L. autumnalis* comenzara a partir de los 30 días alcanzado el 100%, el 70% de las semillas geminadas se encontrarán en estadio de protocormo, a su vez comenzara la formación de PLB's en la superficie del mismo entre los 30 y 50 días. A partir de los 85 días de cultivo comienza la de plántulas completas a partir de plántulas originales como de PLB's.

Paquete tecnológico para el cultivo *in vitro* de *Bletia neglecta*

Material biológico: semillas maduras de *B. neglecta*

- 1. Desinfestación:** colocar de aproximadamente 200 semillas en sobres de papel filtro. Sujetar cada sobre con un clip metálico. Sumergir los sobres en agua destilada para extraer el aire. Transferirlos a una solución de etanol a 70% (v/v) durante 5 minutos. Dentro de la campana de flujo laminar, colocarlos en una solución de NaOCl al 10% (v/v) por 10 minutos, aplicando agitación constante. Realizar tres enjuagues con agua destilada estéril. Colocar los sobres dentro de una caja Petri hasta el momento de la siembra.
- 2. Siembra *in vitro*:** Dentro de la campana de flujo laminar, con ayuda de pinzas de disección, transferir cada sobre a otra caja Petri y retirar el clip, abrir cuidadosamente de manera que las semillas queden expuestas. Extender el papel con las semillas sobre el medio de cultivo, PETERS_{50%} adicionado con agua de coco y jugo de piña (10% v/v).
- 3. Condiciones de incubación** Los cultivos permanecerán en el cuarto de incubación con una intensidad luminosa de 4670 lux, a una temperatura de 25° C +/- 2° y fotoperiodo de 16/8.
- 4. Desarrollo:** La germinación para *B. neglecta* comenzara a partir de los 30 días alcanzado el 100%, a su vez comenzara la formación de PLB's en la superficie del mismo entre los 30 y 50; así como también desdiferenciación de masa callosa. A partir de los 85 días de cultivo comienza la de plantulas completas a partir de plantulas originales como de PLB's.

Paquete tecnológico para el cultivo *in vitro* de *Prosthechea cochleata*

Material biológico: semillas maduras de *P. cochleata*

- 1. Desinfestación:** colocar de aproximadamente 200 semillas en sobres de papel filtro. Sujetar cada sobre con un clip metálico. Sumergir los sobres en agua destilada para extraer el aire. Transferirlos a una solución de etanol a 70% (v/v) durante 5 minutos. Dentro de la campana de flujo laminar, colocarlos en una solución de NaOCl al 10% (v/v) por 10 minutos, aplicando agitación constante. Realizar tres enjuagues con agua destilada estéril. Colocar los sobres dentro de una caja Petri hasta el momento de la siembra.
- 2. Siembra *in vitro*:** Dentro de la campana de flujo laminar, con ayuda de pinzas de disección, transferir cada sobre a otra caja Petri y retirar el clip, abrir cuidadosamente de manera que las semillas queden expuestas. Extender el papel con las semillas sobre el medio de cultivo, KM_{12%} adicionado con agua de coco y jugo de piña (10% v/v).
- 3. Condiciones de incubación** Los cultivos permanecerán en el cuarto de incubación con una intensidad luminosa de 4670 lux, a una temperatura de 25° C +/- 2° y fotoperiodo de 16/8.
- 4. Desarrollo:** La germinación para *P. cochleata* comenzara a partir de los 30 días alcanzado el 100%, de manera conjunta comenzara la formación de PLB's en la superficie de protocormo entre los 30 y 50 días.