



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIOLOGÍA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA
VEGETAL

Germinación asimbiótica *in vitro* de *Sobralia macrantha* Lindl. una orquídea terrestre nativa de México

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO

P R E S E N T A:

Andrea Ruiz Betancourt

Área específica de conocimiento:
Biología Vegetal



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

Ciudad de México, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A la M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales por todo su tiempo, disposición, paciencia, confianza, consejos, apoyo y alegría en el desarrollo de esta tesis, pero, también durante los últimos semestres de mi formación académica, ha influido profundamente en mi formación.

Al Jardín Botánico Xoxotic por permitir conocer su colección de orquídeas y proporcionar el material vegetal para poder elaborar la tesis presentada.

A los miembros del jurado por su tiempo, disposición, aportaciones y comentarios para mejorar el trabajo realizado en esta tesis.

M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales

Biól. Juan Romero Arredondo

Dra. Ana María Soriano Martínez

Dra. Hortensia Rosas Acevedo

M. en C. Florencia Becerril Cruz

Dedicatoria

A mi madre, Alejandra, por su amor incondicional, apoyo, paciencia, comprensión y fortaleza para llegar a este punto a pesar de todas las dificultades y sobre todo por estar siempre presente en mi formación personal y profesional.

A mi familia, por todo su apoyo y palabras de aliento, por la ayuda e impulso para alcanzar mis metas, por su cariño y esfuerzo para reconfortarme en los momentos difíciles.

A mis amigas, Jenny, Fabi y Yael, por toda la alegría y apoyo, por todas las sonrisas y enseñanzas que me brindaron, por el cariño y el lazo que formamos durante más de cuatro años de compartir más que solo clases.

A mis compañeros, Arturo, Chuy, Diego, Nayeli, Irlanda, Mafer, Bel, Miguel, Luis, David, Fernando y Liz por todos los buenos momentos que pasamos en clases, laboratorio y salidas a campo, son recuerdos muy felices que aprecio profundamente.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEÓRICO	6
Generalidades de las orquídeas	6
Flor	6
Inflorescencia.....	9
Fruto	10
Semillas	11
Hojas	13
Tallos.....	14
Raíz	15
Tipos de crecimiento	16
Germinación	17
Cultivo <i>in vitro</i> de células y tejidos vegetales	20
Cultivo <i>in vitro</i> de orquídeas	23
Medios de cultivo.....	24
Sales inorgánicas.....	25
Compuestos orgánicos.....	28
Complejos naturales	31
Materiales inertes y de soporte.....	32
Otros compuestos.....	32
Condiciones de incubación.....	33
Género <i>Sobralia</i> Ruiz & Pav.	34
<i>Sobralia macrantha</i> Lindl.	35
Clasificación taxonómica	37
Nombre común.....	38
Distribución	38
Ecología.....	38
Estado de conservación	38
Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Sobralia macrantha</i> Lindl.	39
JUSTIFICACIÓN	40

HIPÓTESIS	40
OBJETIVOS	41
Objetivo general.....	41
Objetivos particulares.....	41
MÉTODO	42
Obtención del material biológico.....	42
Evaluación de viabilidad	43
Medios de cultivo y esterilización	43
Desinfestación y siembra.....	45
Monitoreo del desarrollo ontogénico	45
Cálculo del porcentaje de germinación y estadios	46
Cálculo del Índice de Desarrollo.....	47
Análisis estadístico.....	47
RESULTADOS.....	48
Viabilidad	48
Ontogenia	49
Germinación de <i>Sobralia macrantha</i>	57
Índice de Desarrollo de <i>Sobralia macrantha</i>	60
Plántulas obtenidas.....	65
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	69
CONCLUSIONES	77
REFERENCIAS.....	79
ANEXOS	87
Anexo 1: Prueba Topográfica por Tetrazolio.	87
Anexo 2: Formulaciones de medio.	89
Anexo 3: Composición de los complejos naturales.	91
Anexo 4: Análisis de varianza para el porcentaje de clorosis por todos los tratamientos.	92
Anexo 4.1: Prueba de Rangos Múltiples para porcentaje de clorosis por tiempo.	92
Anexo 4.2: Prueba de Rangos Múltiples para porcentaje de clorosis por medio nutritivo.	92
Anexo 4.3: Prueba de Rangos Múltiples para porcentaje de clorosis por concentración de sales basales.	92
Anexo 4.4: Pruebas de Rangos Múltiples para porcentaje de clorosis por complejo orgánico.	93
Anexo 5: Análisis de varianza para el porcentaje de germinación por todos los tratamientos.	94
Anexo 5.1: Prueba de Rangos Múltiples para porcentaje de germinación por tiempo.	94

Anexo 5.2: Prueba de Rangos Múltiples para porcentaje de germinación por medio nutritivo.	95
Anexo 5.3: Prueba de Rangos Múltiples para porcentaje de germinación por concentración de sales basales.	95
Anexo 5.4: Prueba de Rangos Múltiples para porcentaje de germinación por complejo orgánico.	95
Anexo 6: Análisis de varianza para el Índice de Desarrollo por todos los tratamientos.	96
Anexo 6.1: Prueba de Rangos Múltiples para I.D. por tiempo.	96
Anexo 6.2: Prueba de Rangos Múltiples para I.D. por medio nutritivo.	96
Anexo 6.3: Prueba de Rangos Múltiples para I.D. por concentración de sales basales.	97
Anexo 6.4: Prueba de Rangos Múltiples para I.D. por complejo orgánico.	97
Anexo 7: Análisis de varianza para el porcentaje de plántulas por todos los tratamientos.	98
Anexo 7.1: Prueba de Rangos Múltiples para porcentaje de plántulas por tiempo.	98
Anexo 7.2: Prueba de Rangos Múltiples para porcentaje de plántulas por medio nutritivo.	98
Anexo 7.3: Prueba de Rangos Múltiples para porcentaje de plántulas por concentración de sales basales.	98
Anexo 7.4: Prueba de Rangos Múltiples para porcentaje de plántulas por complejo orgánico.	99

RESUMEN

Las orquídeas son una de las tres familias de plantas vasculares más diversas en México y también son consideradas las plantas más evolucionadas debido a las modificaciones de sus órganos para el hábito epífito, como son raíces fotosintéticas y recubiertas por un velamen para mantener la humedad, los pseudobulbos para el almacenamiento de nutrientes; y otras modificaciones para la reproducción como el desarrollo de un pétalo modificado (labelo) que atrae al polinizador y la fusión de los órganos reproductivos en una columna o gimnostemo que contiene el polen en paquetes que se adhieren al polinizador para su transporte, las semillas pequeñas y ligeras que permite su fácil dispersión, sin embargo, no cuentan con suficiente cantidad de sustancias nutritivas para su germinación, por lo que establecen relaciones simbióticas con hongos.

Sobralia macrantha es una especie de orquídea terrestre que debido al gran tamaño y belleza de sus flores e incluso a su facilidad de cultivo *in vitro*, ha formado parte de colecciones públicas y privadas; sin embargo, también es una especie afectada debido al saqueo de su ambiente natural para el comercio ilegal y la destrucción de su hábitat, como muchas otras especies de orquídeas.

En el presente estudio se establecieron las bases para la germinación asimbiótica *in vitro* de *Sobralia macrantha* con fines de propagación mediante la comparación de los efectos producidos por dos diferentes fórmulas de medio de cultivo, el Murashige y Skoog (MS) y el Knudson C (KC), así como de tres diferentes concentraciones de sus sales basales, siendo 100%, 75% y 50% las concentraciones evaluadas, también se confrontaron los resultados obtenidos durante el proceso de germinación en diferentes complejos orgánicos como son el agua de coco, papilla de frutos mixtos y papilla de frutos tropicales, y con dos tipos de fuentes de carbono, la sacarosa y el jarabe de maíz.

Los cultivos fueron monitoreados durante 195 días, se estableció como criterio de inicio de germinación de las semillas el rompimiento de la testa, se obtuvo más del 50% de individuos germinados en un periodo de 18 días, el medio que favoreció este proceso principalmente fue el KC que se caracteriza por una composición simple de sales basales, a diferencia del MS, y con la concentración del 50% de las sales inorgánicas permitió una

correcta asimilación de los nutrientes requeridos por *Sobralia macrantha*; además, el proceso de germinación se induce con la adición de la papilla de frutos mixtos.

El medio nutritivo KC a la mitad de su concentración de sales, pero suplementado con jarabe de maíz como fuente de carbono y energía en lugar de sacarosa, promueve el desarrollo de los individuos después de su germinación, obteniendo plántulas sanas y en crecimiento continuo después de seis meses desde la siembra de las semillas de *Sobralia macrantha*.

Durante los días de monitoreo se generó el esquema del desarrollo ontogénico de la especie, brindando información morfológica de cada uno de sus estadios. Además, en dicho esquema, se aprecian los estadios representativos de la germinación de las orquídeas, como son la semilla sin germinar, embrión hinchado y rompiendo la testa, protocormo, formación de rizoides y el primordio foliar, la emergencia de las primeras dos hojas y finalmente de la raíz, brindando información morfológica de cada uno de estos estadios.

INTRODUCCIÓN

Debido a la posición de nuestro país entre las regiones biogeográficas Neártica y Neotropical es considerado uno de los países Megadiversos, aunado con el relieve y la gran variedad de climas México posee una biodiversidad excepcional, ocupando el quinto lugar a nivel mundial en cuanto a diversidad de plantas vasculares (SEMARNAT, 2011).

El territorio nacional alberga aproximadamente 25 mil especies, de las cuales el 40-60% son exclusivas del territorio nacional, es decir, son endémicas (SEMARNAT, 2011). Para el año 2018 se reportaron un total de 24,360 especies de plantas vasculares de las cuales 10,235 son endémicas de México (Sosa, De Nova, & Vásquez-Cruz, 2018).

Entre las familias de plantas vasculares mejor representadas en México están Asteraceae, Poaceae y Orchidaceae (Villaseñor, 2004), esta última contaba con aproximadamente 1,260 especies reportadas en México, de las cuales 585 son endémicas, lo que representaba un 46% de endemismo para nuestro país, hasta el año 2012 (Espejo, 2012); sin embargo, para el año 2018 estas cifras se han incrementado, se cuenta ahora con 1,347 especies de orquídeas en territorio nacional y 49% de éstas, son endémicas (Sosa et al., 2018).

Por otra parte, a nivel mundial la familia Orchidaceae cuenta con alrededor de 18,814 a 27,135 especies agrupadas en un aproximado de 529 a 880 géneros (Zotz, 2013), de las cuales en México solamente se reconocen más de 1,200 especies, pertenecientes a 168 géneros, siendo el sureste del país la zona que posee la mayor diversidad en orquídeas (González-Aguilar & Burelo-Ramos, 2017), principalmente en los estados de Oaxaca, Chiapas y Veracruz (De La Rosa, Andrade, & Torres, 2018) y el Bosque Mesófilo de Montaña (BMM) el ecosistema que alberga la mayor riqueza y diversidad de orquídeas, encontrando en el aproximadamente el 60% de las especies reconocidas para México (Tejeda-Sartorius & Téllez-Velasco, 2017).

Las orquídeas se encuentran distribuidas en casi todo el planeta, estando mejor representadas en los trópicos, ya que probablemente se originaron en el sur de Asia durante el Cretácico y suponiendo que su existencia en la Tierra tiene 40 a 80 millones de años, son consideradas como plantas jóvenes, que se dispersaron tempranamente lo que resultó en su distribución pantropical (Freuler, 2008; Velasco & Beltrán, 2008).

A pesar de ser señalada como una familia joven, Orchidaceae es considerada la más evolucionada en el reino vegetal, ya que presentan una gran complejidad y especialización en su morfología floral y polinización, así como una gran capacidad de adaptación (Espejo, García, López, Jiménez, & Sánchez, 2002; Pardo, 2008). Además, es interesante notar que la evolución de la morfología floral de las orquídeas está estrechamente relacionada a los insectos polinizadores, puesto que la complejidad de las flores sugiere una adaptación a polinizadores con gran precisión de vuelo y que poseen órganos sensoriales bien desarrollados (Velasco & Beltrán, 2008).

En México, algunas especies de orquídeas poseen mucílagos en los pseudobulbos que, debido a la naturaleza aglutinante, se han utilizado como pegamento en la fabricación de instrumentos musicales y plumería, en la elaboración de calaveritas de día de muertos, a diversas orquídeas incluso se les han atribuido usos medicinales, ceremoniales y artesanales (Cox, 2013). Actualmente, son principalmente conocidas por su importancia en la industria de plantas ornamentales, cultivando mayormente variedades híbridas; sin embargo, aún existe el comercio clandestino de especies nativas (Velasco & Beltrán, 2008).

Generalmente, las orquídeas se encuentran restringidas en su hábitat debido a la necesidad de establecer una asociación con hongos micorrízicos específicos, esto ocasiona que sean plantas vulnerables tanto al cambio ambiental como a la destrucción del hábitat, además, por el valor comercial que poseen han sido extraídas especies tropicales desde el siglo XIX para ser transportadas a Europa, lo que ha ocasionado un aumento en la tasa de extinción en el medio natural (Nadarajan, Wood, Marks, Seaton, & Pritchard, 2011).

En el caso de México, la supervivencia de muchas especies de orquídeas se ha visto en peligro debido a la deforestación por aumento de la frontera agropecuaria como una de las principales causas. Otros factores que ponen en riesgo la diversidad de orquídeas son el crecimiento de la mancha urbana, el comercio ilegal, carencia en la legislación y política ambiental, así como el mal ejercicio de las normas y falta de participación de la comunidad (Menchaca & Moreno, 2011).

Además, la familia Orchidaceae posee semillas muy pequeñas, que contienen poca cantidad o ninguna reserva y no presentan endospermo o cotiledones para llevar a cabo el proceso de germinación, por lo que se vuelve necesaria la simbiosis con hongos micorrízicos

que establezcan un flujo de nutrientes, esto dificulta la propagación en el medio natural, siendo muy bajo el porcentaje de individuos germinados en su medio natural; sin embargo, las semillas son el material apropiado para la conservación *ex situ* del material genético debido a la variabilidad genética de las mismas (Mayo, Cázares, De la Cruz, & Flores, 2010).

Debido a estas limitaciones, se ha planteado como una alternativa más eficiente en la regeneración y propagación de plantas realizar la germinación y desarrollo en condiciones *in vitro* (Mayo et al., 2010).

La presente investigación tiene como objetivo establecer un protocolo para la germinación asimbiótica *in vitro* de *Sobralia macrantha* Lindl., comparando el efecto de distintos complejos orgánicos, fuentes de carbono, formulaciones de medio y concentraciones de sales basales.

MARCO TEÓRICO

Generalidades de las orquídeas

El origen de la palabra “orquídea” (del latín *orchis*) se remonta por primera vez a un manuscrito del filósofo Theophrastus, en el que el nombre significa “testículo” y hace alusión a los seudobulbos y al uso medicinal como afrodisiaco y potenciadora de la fertilidad. Con el tiempo la palabra *orchis* derivó en *orchidaceae*, término con el que se designó a la familia más numerosa del reino vegetal (Freuler, 2008).

Las orquídeas pertenecen al grupo de las monocotiledóneas, por lo que son plantas herbáceas, la mayoría de hábitos perennes, viven sobre el suelo (terrestres) o usan otras plantas como sustrato para establecerse (epífitas) e incluso se encuentran en riscos y laderas rocosas (litófitas), y se distinguen de otras plantas por la peculiaridad de sus flores, las cuales son diversas en forma y color (Rittershausen & Rittershausen, 2010; Velasco & Beltrán, 2008; Vidal, Vásquez, & Bauk, 2012).

Probablemente, las especies de orquídeas ancestrales fueron de hábito terrestre, sin embargo, la tendencia evolutiva favoreció las adaptaciones que permitieron el desarrollo del hábito epífito (Arditti, 1992), tanto que actualmente se estima que de todas las especies de orquídeas, el 78% son epífitas (De La Rosa et al., 2018).

Flor

Los integrantes de la familia Orchidaceae presentan flores trímeras con simetría bilateral, que durante su evolución adquirieron caracteres distintivos como el labelo y la columna. En la mayoría de las especies son hermafroditas, es poco común observar dimorfismo en esta familia (Arditti, 1992).

De forma general, la flor de las orquídeas presenta tres sépalos y tres pétalos de los cuales uno de ellos es diferente, es la parte más llamativa y se conoce como “labelo” (Ilustración 1), este puede ser simple u ornamentado con adaptaciones que tienen como finalidad atraer a los insectos polinizadores, por lo que presenta diversas características como guías de néctar, nectarios, callos, aceites o compuestos aromáticos (Arditti, 1992; Freuler, 2008; Menchaca, 2011).

El labelo de algunas especies de orquídeas presenta resupinación, este es un fenómeno en el cual el labelo ocupa una posición adaxial en relación con el eje de la inflorescencia y durante la apertura de los botones el ovario experimenta una torsión de 180°, que lo lleva a ocupar la posición diametralmente opuesta (Velasco & Beltrán, 2008).

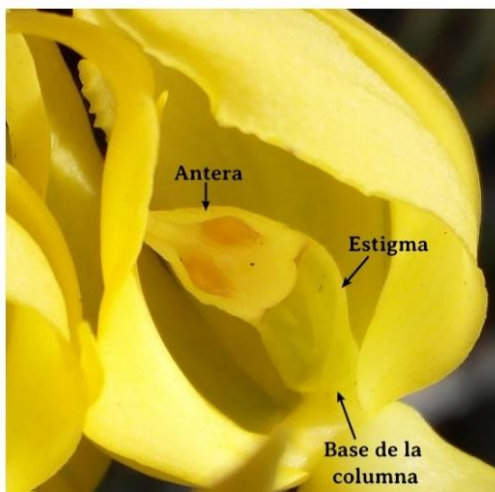


Ilustración 1: Morfología de la flor de orquídea. Sépalos (S), pétalos (P), labelo (L) y columna (C). Fotografía de Ruiz, A.

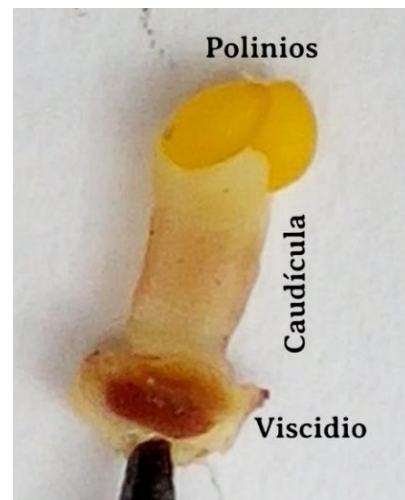
Otra característica importante de las flores de orquídea es la columna o gimnostemo, que se encuentra en el centro, la cual contiene los órganos sexuales femenino y masculino fusionados en una sola estructura (Ilustración 1). La fusión se da entre el estilo y los tres estigmas con los filamentos de los estambres, siendo una fusión completa en las orquídeas más evolucionadas (Arditti, 1992; Velasco & Beltrán, 2008).

En cuanto a la estructura de la columna, se encuentra la antera en la parte superior (Ilustración 2), alojada en una depresión que recibe el nombre de clinandrio y está provista de cuatro sacos polínicos u ocho en las especies más avanzadas, el polen se encuentra agrupado en estructuras llamadas polinios, los cuales se observan como másulas cerosas y compactas. El polinio se encuentra unido al viscidio por un pedículo elástico o caudícula (constituido por elastovicina), el viscidio actúa como un pegamento que fija el polinario (conjunto de polinios, caudícula y viscidio) al insecto visitante una vez se introduce a la flor (Ilustración 3) (Arditti, 1992; Velasco & Beltrán, 2008).

Mientras que en la parte interna de la columna se encuentra una zona brillante y ligeramente cóncava que corresponde a los estigmas (Ilustración 2), la zona estigmática produce un líquido azucarado y viscoso que permite que se quede adherido el polen cuando el polinizador se introduce en la flor. De los tres estigmas que poseen las orquídeas, dos están soldados entre sí y son funcionales, mientras que el tercero es estéril y en algunos casos se ha transformado en una expansión del tejido en forma de pico llamado rostelo, que es un órgano típico de las orquídeas que separa la antera del estigma de la misma flor, evitando así la autofecundación (Arditti, 1992; Velasco & Beltrán, 2008).



*Ilustración 2: Morfología de la columna.
Fotografía de Ruiz, A.*



*Ilustración 3: Morfología del polinario.
Fotografía de Ruiz, A.*

La mayoría de las orquídeas son polinizadas por insectos, los cuales se posan en el labelo, este funciona como una pequeña bisagra, de manera que el insecto se pueda acomodar y solo el que tenga el tamaño idóneo logra entrar en la flor, y cuando este emerge el tramo

pegajoso unido a los polinios o másulas se adhiere a la cabeza o tórax, transportándolos y depositándolos en el estigma de otra flor, entonces cada grano de polen puede comenzar la formación del tubo polínico para el transporte de los gametos masculinos hacia los óvulos y fecundar alguno de ellos (Rittershausen & Rittershausen, 2010).

El ovario es ínfero, en el caso de las especies más antigua es sincárpico, mono o tricarpelar y con placentación axilar, mientras que en las más avanzadas el ovario es monocarpelar con placentación parietal (Arditti, 1992).

Inflorescencia

Las flores de las orquídeas se encuentran agrupadas en inflorescencias y nacen en la axila de una bráctea foliácea o escuamiforme. Las inflorescencias muestran pocas o muchas flores distribuidas de manera densa o laxa y frecuentemente se alarga durante el curso de la floración (Velasco & Beltrán, 2008).

Los tipos de inflorescencias en la familia Orchidaceae también son diversos, por lo que se han clasificado de la siguiente manera (Menchaca, 2011):

1. Por la inserción de la vara floral en la planta (Ilustración 4).

- ✿ Axilar: surge de entre el tallo y la hoja.
- ✿ Basal: emerge de la base del seudobulbo.
- ✿ Terminal: se desarrolla en la punta del seudobulbo.

2. Por su forma (Ilustración 5).

- ✿ Espiga: las flores aparecen a partir de una vara central.
- ✿ Panícula: la vara floral presenta varias ramificaciones, produciendo una gran cantidad de flores.
- ✿ Racimo: la vara floral presenta una ramificación donde se desarrollan las flores.
- ✿ Umbrela: al final de la vara floral aparecen todas las flores alineadas en filas.

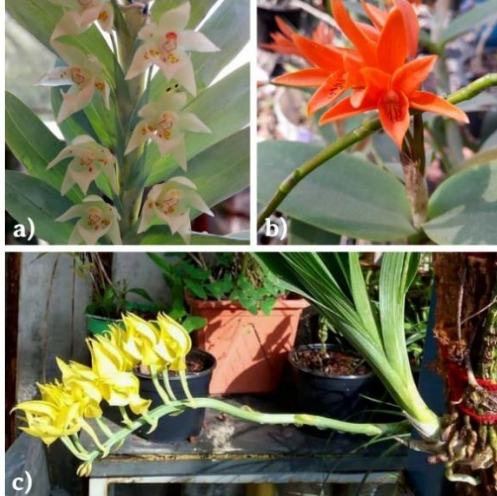


Ilustración 4: Inflorescencias por su inserción en la planta. a) axilar, b) terminal y c) basal. Fotografía de Ruiz, A.



Ilustración 5: Inflorescencias por su forma. a) espiga, b) panícula, c) racimo y d) umbrela. Fotografía de Ruiz, A.

Fruto

Una vez fertilizadas las flores, comienza la formación de un fruto nombrado botánicamente como cápsula, la cual contiene las semillas y para liberarlas las valvas que forman los lóculos se separan total o parcialmente cuando el fruto se seca (Ilustración 6) (Arditti, 1992; Menchaca, 2011).



Ilustración 6: Cápsulas de orquídea. Fotografía de Ruiz, A.

Semillas

En el caso de la familia Orchidaceae las semillas son muy pequeñas, parecidas al polvo, de tamaños y formas variables, cuentan con una cubierta coriácea o papirácea llamada testa que está reticulada y algunas veces ornamentada o con sustancias liposolubles en la superficie, el embrión es aún más pequeño y ocupa muy poco espacio dentro de la semilla, ya que del 70% al 90% de la semilla está constituida por aire (Ilustración 7 y 8), lo que le permite dispersarse por viento (Arditti, 1992).



Ilustración 7: Semillas de orquídea. Fotografía de Ruiz, A.

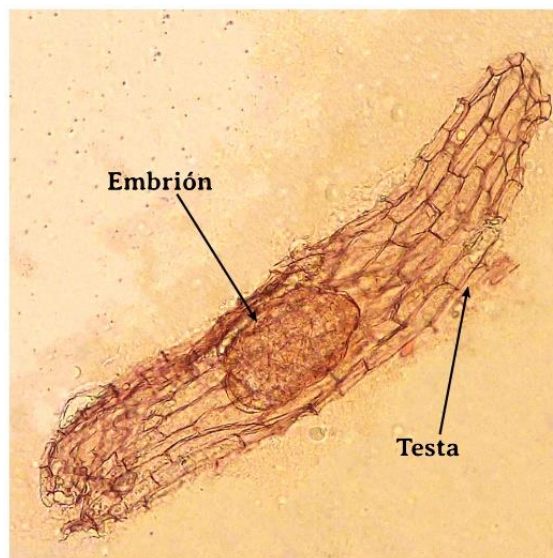


Ilustración 8: Testa reticulada y embrión de orquídea. Fotografía de Ruiz, A.

Carecen o poseen una cantidad limitada de endospermo o cotiledones, el embrión es esférico o globular conformado de entre ocho y 200 células, cubierto por una testa que suele ser mucho más grande que el embrión, está formada por células muertas que mantienen la lignina y la celulosa, estas características permiten a las semillas ser ligeras y poder dispersarse con ayuda del viento, en algunas ocasiones la cubierta se encuentra impregnada de sustancias que inhiben o retardan la germinación (Arditti, 1967; Menchaca, 2011).

Las semillas de las orquídeas no tienen una diferenciación histológica evidente, ya que durante la división del cigoto la primera división origina una células basal (que después se divide horizontalmente originando la célula inicial del suspensor y la célula basal del embrión) y una terminal; sin embargo, se pueden presentar diversas morfologías de suspensor que tienen de una hasta más de 30 células, pero no en todas las especies se presentan suspensores de morfología distintiva (Arditti, 1992; Park & Yeung, 2018).

A pesar de no tener un patrón tisular reconocible, se diferencian tamaños de células, siendo las más pequeñas aquellas que están en el ápice (zona chalazal) y que están destinadas a formar la zona meristemática, mientras que las células largas son las basales (zona micropilar) y alojaran al simbiote, además, la capa superficial del embrión se ha especializado en las células han adquirido características epidérmicas (Yeung, Li, & Lee, 2018).

En semillas maduras de orquídea se encuentra ausente el endospermo, debido a que durante la fertilización el núcleo gamético no aparece para fusionarse con los núcleos polares, o en algunos casos la fusión no se completa (Yeung et al., 2018). Las reservas de las semillas a pesar de ser pocas, están compuestas principalmente por lípidos; sin embargo, no son suficientes para el proceso de germinación por lo que se vuelve necesario establecer la simbiosis con hongos micorrízicos que proporcionen los nutrientes necesarios para llevar a cabo el proceso de germinación (Arditti, 1967).

Evolutivamente, la pérdida del endospermo ocasionó que la mayoría de las orquídeas sean heterótrofas durante la germinación y estadios tempranos; sin embargo, otras especies han tendido al desarrollo de un comportamiento similar al parasitismo como resultado de la

dependencia al hongo específico, esto sugiere que tal vez esta fuerte relación de dependencia es un carácter avanzado en esta familia (Arditti, 1992).

La longevidad de las semillas es muy variable en las especies de orquídeas, pudiendo mantener la viabilidad menos de un mes o por muchos meses, cuando se desea mantener las semillas por largos periodos de tiempo lo recomendable es almacenar en temperaturas bajas y sin humedad (Arditti, 1967).

Hojas

Entre otras características de las orquídeas se encuentran las hojas, las cuales son típicas de las monocotiledóneas, es decir, que en su mayoría son simples y con márgenes enteros u ondulados-crespados, no poseen aserraduras ni espinas, con venación paralela, por lo general son alargadas y angostas, pero llegan a ser muy diversas en formas y tamaños (Ilustración 9), varían en color entre el verde claro y oliva oscuro, parten del seudobulbo, encontrándose de una a varias, en especies terrestres pueden no presentarse durante largos periodos de tiempo (Arditti, 1992; Menchaca, 2011; Rittershausen & Rittershausen, 2010).



Ilustración 9: Diversidad en formas y tamaños de hoja en orquídeas. a) lanceolada, b) cordada, c) ensiforme, d) linear, e) ovada, f) terete o cilíndrica, g) falcada, h) conduplicada, i) aristada, j) lanceolada, k) linear con vaina y l) elíptica. Fotografía de Ruiz, A.

Tallos

En cuanto al tallo de las orquídeas, de forma general es un tallo erecto herbáceo, con uno o varios entrenudos de donde emergen las hojas e inflorescencias, se piensa que evolucionó de rizomas esbeltos y tallos largos, después los pseudobulbos comenzaron a reducir el número de entrenudos hasta presentar solamente uno en las especies más avanzadas; sin embargo, actualmente se pueden distinguir cuatro tipos de tallos diferentes (Ilustración 10) que se describen a continuación (Arditti, 1992; Menchaca, 2011; Rittershausen & Rittershausen, 2010):

1. Estolón: el tallo es de crecimiento horizontal sobre el suelo, se llega a presentar en especies epífitas y litófitas.
2. Rizoma: es un tallo de crecimiento horizontal debajo del suelo, se presenta en la mayoría de las especies terrestres con formas voluminosas.
3. Cormo: tallos esféricos subterráneos que poseen la capacidad de almacenar reservas (almidón principalmente) y agua.
4. Pseudobulbo: es el tallo más característico de las especies epífitas y, a pesar de presentar diversas formas y tamaños (Ilustración 11), de forma general es grueso y sirve como órgano de reserva; ya que, por dentro consiste en un material fibroso que puede retener gran cantidad de agua, asegurando la supervivencia en épocas de sequía.



Ilustración 10: Tallos de las orquídeas. a) estolón, b) rizoma, c) cormo y d) pseudobulbo. Fotografía de Ruiz, A.



Ilustración 11: Diversidad de seudobulbos. a) pigmentado, b) oblongo, c) cubiertos por brácteas, d) ovoide, e) globoso, f) fusiforme, g) articulado, h) elipsoide, i) comprimido y j) cilíndrico. Fotografía de Ruiz, A.

Raíz

Las raíces de las orquídeas poseen características particulares ya que no se producen con tanta abundancia como en otras plantas y suelen estar asociadas a hongos micorrízicos en las primeras etapas del desarrollo para la obtención de nutrientes, las especies terrestres tienen raíces fibrosas (delgadas y alargadas) muy pocas veces ramificadas aunque en algunas ocasiones son de apariencia coraloide, su epidermis consiste en una a tres capas de células y a veces se presentan pelos absorbentes, por otro lado, las especies epífitas poseen raíces carnosas y gruesas capaces de realizar fotosíntesis que se originan en la base del seudobulbo, están recubiertas por una epidermis de varias capas celulares que forman el velamen que progresa por detrás de la punta de crecimiento; el velamen está formado por varias capas de células esponjosas y la capa exterior está cubierta por cutina y está desprovista de pelos adsorbentes (Ilustración 12), esta capa puede o no presentarse en especies terrestres y facilita la retención de humedad, la regulación del flujo de CO₂, la absorción de agua y minerales, es protección mecánica y ayuda en la fijación al sustrato (Arditti, 1992; Menchaca, 2011; Rittershausen & Rittershausen, 2010).

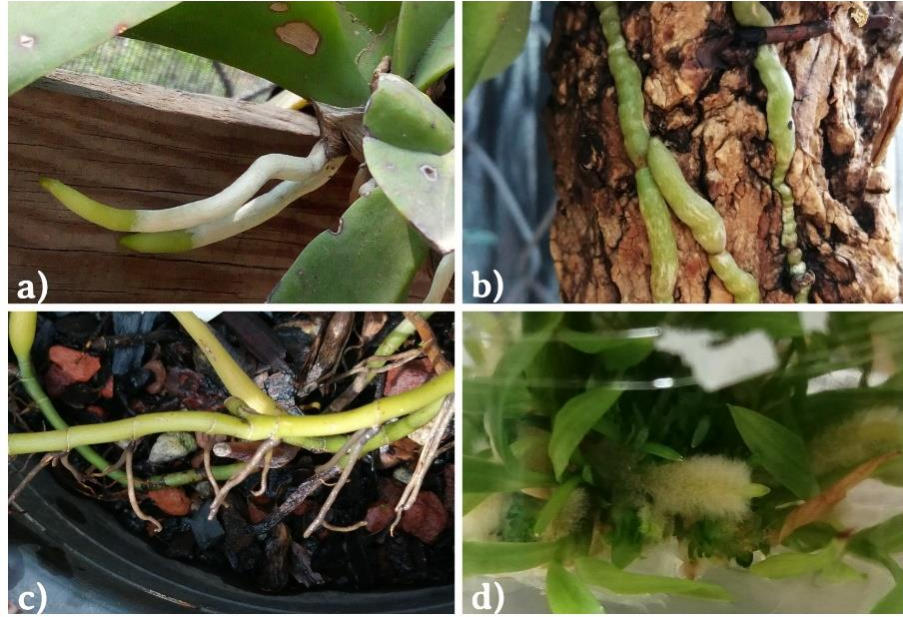


Ilustración 12: Raíces de las orquídeas. a) raíz de epífita cubierta con velamen, b) raíz fotosintética hidratada, c) raíces fibrosas no fotosintéticas y d) raíz con pelos absorbentes. Fotografía de Ruiz, A.

Tipos de crecimiento

En la familia Orchidaceae se observan dos tipos de crecimiento: monopodial y simpodial (Ilustración 13), las orquídeas más primitivas presentan crecimiento simpodial, ya que la tendencia evolutiva es el crecimiento monopodial, esta tendencia se ha desarrollado independientemente en el tiempo en diferentes líneas evolutivas (Arditti, 1992).

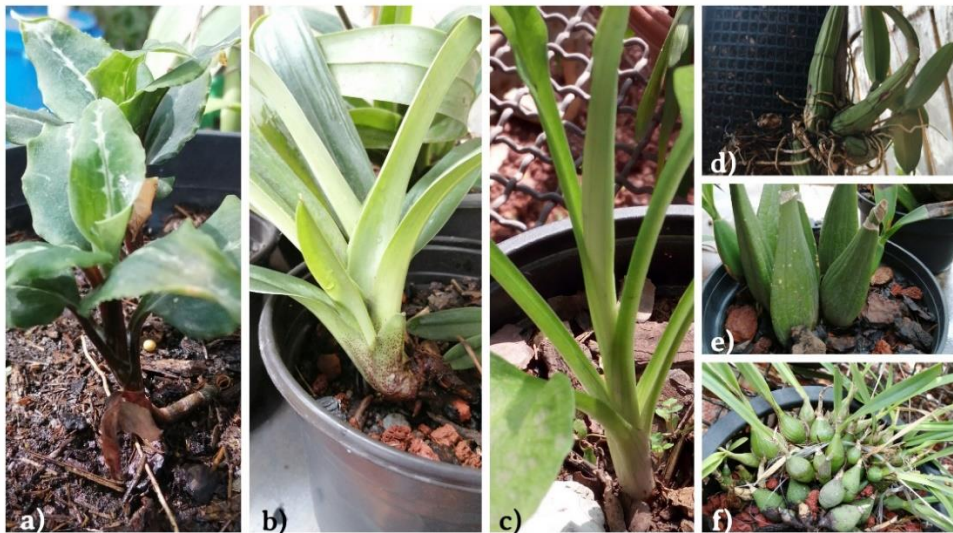


Ilustración 13: Tipos de crecimiento. a), b) y c) monopodial; d), e) y f) simpodial. Fotografía de Ruiz, A.

La planta monopodial tiene un punto de crecimiento, no presentan pseudobulbos, crece verticalmente, las hojas surgen del extremo apical, las raíces se originan sobre el tallo debajo de las hojas, las flores se forman de yemas axilares, sus hojas gruesas cumplen funciones de fotosíntesis y reserva, por el contrario, la planta simpodial tiene varios puntos de crecimiento, presenta pseudobulbos, crece horizontalmente, las hojas crecen a partir del pseudobulbo, las raíces se originan en el pseudobulbo y el rizoma, las flores pueden originarse de yemas en los extremos de los pseudobulbos o en la base de las hojas e incluso en la base de la planta, sus hojas son más finas, dado que la función de reserva la cumple el pseudobulbo (Freuler, 2008).

Germinación

A pesar de la gran cantidad de semillas encontradas dentro de la cápsula de las orquídeas, que va de 2 a 3 millones, se considera que solamente del 2 al 3% de estas semillas logran germinar en su medio natural (Mayo et al., 2010).

Las semillas requieren de hongos generalmente del género *Rhizoctonia* para germinar, estableciendo una relación simbiótica llamada micorriza, esta es necesaria ya que las semillas de orquídea carecen casi por completo de sustancias de reserva y endospermo, conteniendo cantidades limitadas de lípidos y proteínas, por lo que el hongo establece un flujo de nutrientes como carbohidratos, minerales, vitaminas, hormonas y aminoácidos al embrión para su germinación y en especies epífitas también aporta resistencia a la desecación (Mayo et al., 2010; Velasco & Beltrán, 2008).

La micorriza establecida es de tipo endótrofo, es decir, que las hifas del hongo no solo están presentes en los espacios intercelulares sino que penetran en las células de la orquídea para posteriormente ser aprovechadas; además esta relación se puede mantener durante todo el desarrollo y crecimiento de la orquídea en el caso de que sea una especie heterótrofa o solamente hasta que la planta sea capaz de sintetizar la cantidad suficiente de hidratos de carbono; sin embargo, a menudo el hongo que invade el tejido embrionario mantiene la asociación con la orquídea durante toda la vida de esta (Velasco & Beltrán, 2008).

En la micorriza endótrofa, las hifas crecen formando un ovillo en el citoplasma de las células, el hongo aprovecha la protección, mantenimiento de un ambiente húmedo y captación de nutrientes cuando se encuentra en las capas celulares externas de la raíz, pero

en las capas internas de las células de las orquídeas se digieren los ovillos, y de esta forma aprovechar las sustancias nutritivas del hongo y mantener la relación de equilibrio entre ambos. La resistencia de la orquídea a los hongos micorrícicos se debe a la producción de fitoalexinas que inhiben el crecimiento de los mismos, evitando el parasitismo (Velasco & Beltrán, 2008).

Durante la germinación el embrión, que consta apenas de unos cientos de células, se hincha, aumentando varias veces su tamaño hasta formar una hendidura en la testa, posteriormente el embrión comienza a tomar la forma esférica o de cono, y en la superficie comienza a ser evidente el primordio foliar como un bulto, mientras que en la parte basal (parte opuesta al primordio), se cubre de pelos protocórmicos o rizoides que en ausencia de la radícula cumple la función de absorber nutrientes, finalmente emerge la primer hoja y aparece la raíz, obteniendo así una planta en miniatura que continuará su desarrollo y crecimiento (Ilustración 14) (Arditti, 1967; Velasco & Beltrán, 2008).

Por otro lado, en las plantas con rizoma la yema originada del embrión forma el tallo subterráneo del que posteriormente se desarrollaran raíces carnosas, seguidas del tallo aéreo, en las plantas con tubérculos la yema produce una hoja y un tubérculo aislado, la yema después formara un rizoma del que surgirán raíces, el rizoma se unirá al tubérculo y la yema terminal producirá más hojas, mientras que se forma un segundo tubérculo más carnoso bajo tierra y se separa de la planta madre, de este modo desaparece la yema terminal y el crecimiento continua en las yemas axilares, originando un crecimiento simpódico (Velasco & Beltrán, 2008).

En las orquídeas terrestres es de vital importancia que la simbiosis con el hongo se mantenga durante los estadios tempranos de desarrollo ya que el rizoma enterrado aun no es capaz de fabricar por sí mismo las sustancias que requiere para el desarrollo de las estructuras de la planta adulta (Velasco & Beltrán, 2008).

El proceso de germinación no solamente ocurre en el ambiente natural de la orquídea, también se da en condiciones *in vitro*, en este caso se pueden seguir dos vías: la germinación simbiótica y la germinación asimbiótica (Mayo et al., 2010; McKendrick, 2000).

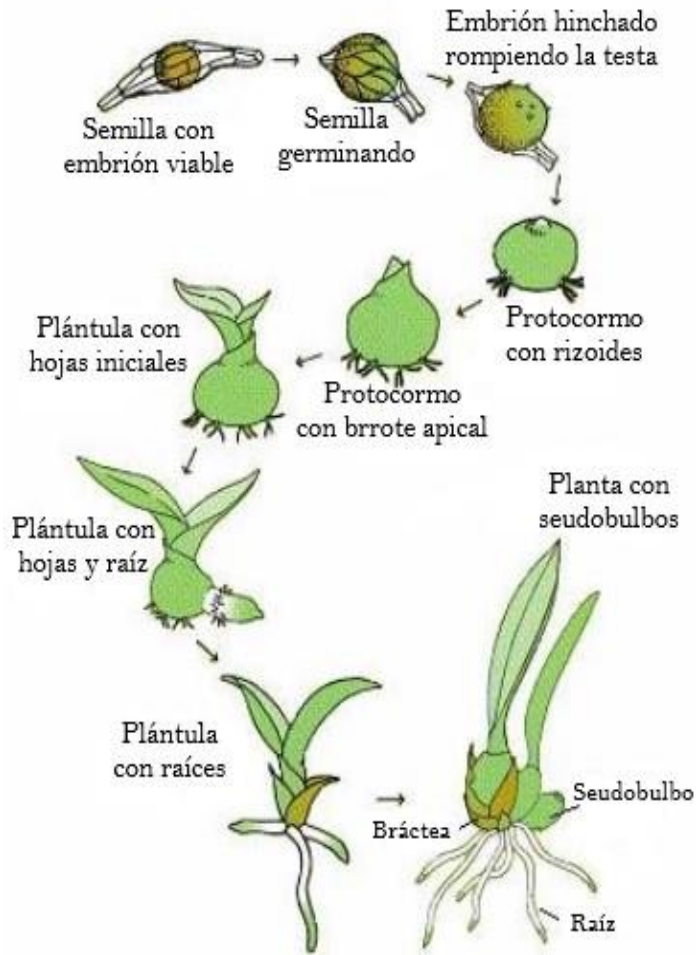


Ilustración 14: Germinación de *Laelia sp.* (Seaton & Ramsay, 2005).

La germinación simbiótica consiste en el co-cultivo de la semilla de orquídea y el hongo micorrízico apropiado para la especie, para ello se requiere del aislamiento y cultivo del hongo en un medio específico, y posteriormente se inocula al hongo en el medio para la germinación de las semillas de orquídea, para que el hongo colonice la semilla, estableciéndose la relación simbiótica, esta técnica es ampliamente utilizada para propagar orquídeas terrestres de zonas templadas, además, tiene como ventaja que el medio a utilizar es simple en composición y las plantas resultantes son resistentes a infecciones, como desventaja se encuentra la selección del hongo adecuado para el establecimiento de la simbiosis (Mayo et al., 2010; McKendrick, 2000).

Por otra parte, la germinación asimbiótica se lleva a cabo sin la presencia de hongo en un medio de cultivo más complejo, el cual debe proporcionar todos los nutrientes requeridos

para la germinación en sus formas disponibles para la correcta asimilación, esta vía es usada para propagar orquídeas de zonas tropicales ya que tienden a crecer fácilmente a comparación de sus parientes de zonas templadas (Mayo et al., 2010; McKendrick, 2000).

El protocormo es uno de los estadios iniciales y representativos después de la germinación de las semillas de orquídea; sin embargo, presentan una alta totipotencialidad, lo que favorece en algunas ocasiones la formación de PLB's (protocorm-like bodies o cuerpos parecidos a protocormos) los cuales son capaces de regenerarse y formar una planta completa, este estadio presenta polaridad, en la región apical se encuentran un cúmulo de células que forman el ápice de brote, mientras que en la región basal se encuentran células parenquimatosas que funcionan como depósito orgánico (Nava et al., 2011).

Cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales

El cultivo de células y tejidos vegetales se refiere al conjunto de técnicas utilizadas para crecer células, tejidos u órganos vegetales *in vitro*, bajo condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos, estas técnicas se basan en el principio de totipotencia, esto quiere decir que cualquier células vegetal contiene una copia íntegra del material genético sin importar la función o la posición que tenga esta célula en la planta a la que pertenece y por lo tanto tiene la capacidad de regenerar una planta completa (Calva & Pérez, 2005).

El procedimiento consiste en inocular en medio de cultivo un explante, que previamente fue desinfectado para eliminar todo organismo que se encuentre en la superficie (Calva & Pérez, 2005). El explante es el tejido, órgano o embrión que se utilizará para obtener una planta igual a la planta donadora, este puede provenir de raíces, hojas, meristemos vegetativos o reproductivos, semillas, tallos, ápices o yemas laterales, inflorescencias jóvenes, tejido ovular o embriones, anteras o granos de polen, en general, los meristemos son el material vegetal más utilizado (Rojas, García, & Alarcón, 2004).

La planta donadora o planta madre debe reunir características deseables y sobresalientes en cuanto a producción, calidad, tolerancia a plagas o ambientes extremos, entre otras, debido a que se obtendrán clones a partir de los explantes tomados, también es importante considerar la edad del explante, que esté libre de enfermedades, que al momento

de tomar el explante no se encuentre en condiciones de estrés y preferiblemente la planta debe encontrarse en crecimiento activo (Rojas et al., 2004), pero, también deben considerarse los pre-tratamientos aplicados y las condiciones de luz y temperatura en que se mantendrán los cultivos para asegurar el éxito (Preece, 2008).

Cuando se utilizarán semillas para el cultivo *in vitro* es importante considerar la latencia, ya que esta retrasa la germinación cuando el medio externo no es favorable, generalmente se presenta en especies de ambientes templados (Preece, 2008).

Una vez establecido el cultivo, se incuba en condiciones de luz, temperatura y humedad controladas, que en conjunto con las características fisicoquímicas y nutricionales del medio de cultivo conducen el desarrollo del explante (Calva & Pérez, 2005).

La morfogénesis se refiere a los cambios estructurales que ocurren durante el desarrollo de un individuo, en condiciones *in vitro* la morfogénesis es la ruta para la obtención de órganos o embriones partiendo de un explante inoculado en un medio de cultivo; sin embargo, no todas las células poseen esta capacidad, aquellas que la poseen son llamadas células competentes (Villareal, 2015).

Las rutas morfogénicas que sigue el explante en su desarrollo son la indirecta si se genera una masa indiferenciada de células llamada callo y de esta se forman embriones somáticos (embriogénesis) o partes vegetativas como brotes o raíces (organogénesis); o se puede seguir la ruta directa, en la cual el explante comienza la embriogénesis u organogénesis sin formar callo (Rojas et al., 2004).

De manera general, la organogénesis ocurre partiendo de meristemos o secciones de tejido diferenciado que son tomados de la planta madre, su crecimiento es acelerado en condiciones *in vitro*, obteniendo la regeneración del individuo mediante la formación de órganos nuevos o la producción de callo por dediferenciación de células, seguida de la rediferenciación del callo para generar varios individuos completos (Villareal, 2015).

En la embriogénesis se obtienen embriones somáticos con la misma capacidad de germinar y formar plántulas completas que un embrión cigótico; sin embargo, su material genético será idéntico al de la planta madre y no contienen tejidos de reserva, por lo que su germinación ocurre *in vitro* asegurando la fuente de nutrientes requerida, estos embriones

pueden formarse directamente del explante o partiendo de la diferenciación de células procedentes de tejido callosos (Villareal, 2015).

Las células vegetales pueden cambiar su destino morfogénico como respuesta a estímulos, tales como sustancias reguladoras del crecimiento; sin embargo, no todas las células que conforman un tejido responden de forma similar al estímulo debido a que algunas no pueden percibirlo, esto genera cambios a lo largo del desarrollo de la planta, pasando del estado juvenil al adulto o generando estadios transitorios como el callo (Preece, 2008).

La morfogénesis se puede ver afectada por cambios inmediatos en el ambiente de cultivo, debido a que se fomenta un aumento de la plasticidad celular ocasionando aberraciones en el desarrollo, como tejidos menos diferenciados que los normales, incremento en el número y tamaño de células así como de espacios intercelulares, menor número de estomas, cloroplastos con grana pequeñas y sin granos de almidón, se ve afectado el patrón de desarrollo del sistema vascular; por lo que el desarrollo *in vitro* puede ser controlado mediante el microambiente de cultivo (Ziv & Chen, 2008).

Las plantas cultivadas *in vitro* realizan fotosíntesis; sin embargo, al ser mantenidas en condiciones de alta humedad relativa, baja intensidad luminosa y baja concentración de dióxido de carbono, las plántulas son morfológica, anatómica y fisiológicamente anormales, en comparación con una planta que se encuentra en su ambiente natural, pueden presentar alta o baja densidad de estomas, aparato estomatal poco funcional y baja tasa fotosintética, entre otras características, para corregir estas anomalías y que las plantas sean funcionales en condiciones *ex vitro* se requiere de un periodo de aclimatización (Nava et al., 2011).

Para poder transferir las plántulas a condiciones *ex vitro* es necesario que el sistema radicular este desarrollado y estas pueden ser inducidas con el balance de fitohormonas y las condiciones de cultivo; sin embargo, suelen ser delgadas y más difíciles de inducir en especies leñosas que en herbáceas. Por otro lado, las hojas contienen las estructuras de un tejido normal de hoja pero no completamente desarrollado, esta condición puede permanecer aun después del periodo de cultivo; durante el cultivo se puede observar un tejido empalizada más delgado, tejido epidérmico defectuoso y sin cutícula, las ceras epicuticulares están finamente depositadas y su composición es muy diferente a las que se encuentran en

hojas normales, además, las células guarda de los estomas no son funcionales, por lo que durante la aclimatización las hojas deben terminar su desarrollo y adquirir las funciones necesarias que le permitan a la planta sobrevivir en condiciones ambientales distintas (Ziv & Chen, 2008).

Entre las posibilidades de aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos destacan los estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica y ciencias afines, bioconversión y producción de compuestos útiles, incremento de la variabilidad genética, obtención de plantas libres de patógenos, propagación de plantas, conservación e intercambio de germoplasma, entre otras (Roca & Mroginski, 1991).

Cultivo *in vitro* de orquídeas

Las orquídeas tradicionalmente han sido propagadas tanto de forma sexual como asexual, esta última tiene ventajas como la obtención de plantas de la calidad deseada en mayor cantidad, en menor tiempo y en cualquier época del año. La propagación asexual se puede llevar a cabo por separación de bulbos, cultivo de pseudobulbos viejos y formación de hijuelos (keikis), mientras que en la propagación sexual la germinación de semillas en medio de cultivo es el método más utilizado (Menchaca, 2011).

El descubrimiento de la germinación asimbiótica por Lewis Knudson en 1921 fue el primer procedimiento práctico en la propagación *in vitro*, formulando un método para la germinación asimbiótica en orquídeas. Sin embargo, el nacimiento de la micropropagación de orquídeas fue hasta 1960 cuando Morel cultivo por primera vez meristemas de tallo de *Cymbidium*. También se ha inducido callo, embriogénesis somática directa e indirecta, regeneración de brotes a partir de segmentos de hoja, nudo, escapo floral, raíz, rizoma y pseudobulbos, además de la regeneración y producción de PLB's en cultivo de células y suspensión, lo que ha beneficiado la producción de orquídeas ornamentales e investigaciones en transgénicos, mejorando la calidad, el tiempo de vida, belleza de las flores y generando híbridos atractivos para el mercado (Musharof et al., 2013).

Después del descubrimiento de Knudson en la germinación de semillas de diferentes especies de *Cattleya* en medio con azúcar de manera asimbiótica, continuó en 1946 proponiendo una nueva solución con nutrientes para la germinación, el cultivo de orquídeas

comenzó su evolución hasta lograr la propagación y regeneración exitosa de orquídeas partiendo de segmentos de hoja, segmentos nodales de plántulas germinadas *in vitro*, nudos florales, ápices y rizomas (Mayo et al., 2010).

Particularmente para la germinación de semillas de orquídeas, los medios reportados para uso generalizado son Knudson C, MS (Murashige y Skoog), Hutner, Dalla Rosa y Laneri, VW (Vacin y Went) y Lindemann (Mayo et al., 2010), cuando no se conocen los requerimientos nutrimentales de la especie, se puede utilizar el medio MS ya que se han obtenido respuestas favorables en la mayoría de las especies de plantas (Pierik, 1990).

La embriogénesis somática es un método potencial para la propagación en masa de orquídeas, siendo más eficiente que la organogénesis ya que se obtienen mayor número de plantas en un menor tiempo, pero en esta familia no ha sido bien documentado la formación de embriones somáticos; sin embargo, análisis histológicos y citológicos han confirmado que los PLB's son equivalentes a los embriones somáticos. La respuesta morfogénica en las orquídeas depende del explante y el nivel endógeno de hormonas, a pesar de esto la concentración y combinación de reguladores de crecimiento vegetal es crítico en el desarrollo (Musharof et al., 2013).

El aislamiento de protoplastos en la familia Orchidaceae comenzó en 1978, el cultivo de protoplastos ha sido un método eficiente en la regeneración de plantas y una herramienta en el mejoramiento de orquídeas (Musharof et al., 2013).

En el cultivo *in vitro* de orquídeas las necesidades minerales generalmente son pocas, recomendándose un medio pobre en sales para las especies terrestres pero mucho más complejo, por ejemplo, adicionando el hongo micorrízico, mientras que las especies epífitas necesitan un medio más rico en sales de no realizarse el cultivo con simbionte (Pierik, 1990).

Medios de cultivo

Un medio de cultivo es definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los explantes cultivados *in vitro* (Cruz, 2012). Este conjunto de elementos abióticos (fiscoquímicos) también proveen anclaje y estimulación para el desarrollo del explante, su consistencia puede

ser sólida, semisólida o líquida. Existen diferentes fórmulas que difieren entre ellas en la concentración de los elementos que los conforman (Rojas et al., 2004).

De forma general, un medio de cultivo está compuesto de sales inorgánicas, compuestos orgánicos, complejos naturales y materiales inertes de soporte (Merino, 1987).

A diferencia de los medios de cultivo, los medios nutritivos contienen solamente las sales basales necesarias para el crecimiento *in vitro* de células y tejidos, sin añadir más compuestos (Jáuregui & Chávez, 2006).

Para garantizar el suministro de nutrientes en condiciones *in vitro* la composición del medio de cultivo debe ser similar a la ofrecida por el suelo en el medio natural de la planta, por ende, no existe un medio universal para todas las especies y propósitos (Boeri, 2015).

La composición del medio de cultivo consta de la combinación de diferentes sustancias que son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta, y que además determina la respuesta morfológica que se obtendrá, por lo que hay una gran variedad de fórmulas en el mercado (Boeri, 2015).

Sales inorgánicas

Puesto que las plantas *in vitro* crecen en un medio artificial es necesario que este contenga los elementos necesarios para dar el soporte nutritivo a las plántulas, estos elementos inorgánicos son esenciales, ya que sin ellos la planta no puede completar su ciclo de vida, no se pueden sustituir por otros elementos, tienen un efecto directo en el organismo y/o son constituyentes de moléculas esenciales, además se dividen en dos categorías: los macronutrientes que son los iones que se requieren en cantidades altas y los micronutrientes que son esenciales para el desarrollo, pero se requieren en pequeñas cantidades ya que un exceso causaría toxicidad (George & de Klerk, 2008; Rojas et al., 2004; Yam & Arditti, 2018).

Los macronutrientes son:

- ✿ Nitrógeno (N): es esencial para la planta ya que forma parte de proteínas, ácidos nucleicos y algunas veces en la clorofila, la morfogénesis *in vitro* está

fuertemente influenciada por la disponibilidad de nitrógeno en el medio (George & de Klerk, 2008).

- ✿ Fosforo (P): es un elemento vital debido a su presencia en macromoléculas como ácidos nucleicos, fosfolípidos y co-enzimas, unidos a moléculas de azúcar proveen energía en la respiración y la fotosíntesis (George & de Klerk, 2008).
- ✿ Potasio (K): tiene una contribución significativa en el mantenimiento del potencial osmótico de las células y el pH, regulando la turgencia en las células (importante para el cierre y apertura de los estomas) y actuando como cofactor de proteínas para convertirlas en enzimas activas (George & de Klerk, 2008).
- ✿ Sodio (Na): generalmente no es requerido para el desarrollo y crecimiento celular; sin embargo, actúa como un estabilizador osmótico en plantas halófitas y en algunas especies puede estimular el crecimiento (George & de Klerk, 2008).
- ✿ Magnesio (Mg): es un componente esencial de la clorofila e interviene en la síntesis de ATP y algunas veces en la actividad de las enzimas (George & de Klerk, 2008).
- ✿ Azufre (S): es requerido para la síntesis de lípidos y en la formación de puentes de disulfuro en las proteínas y sitios activos en las enzimas (George & de Klerk, 2008).
- ✿ Calcio (Ca): ayuda a balancear los aniones en la planta y en la síntesis de celulosa, es cofactor de enzimas que hidrolizan ATP, la deficiencia de este elemento puede ocasionar la inhibición del crecimiento de la raíz y la muerte del ápice de los brotes (George & de Klerk, 2008).
- ✿ Cloro (Cl): participa en la osmorregulación celular y turgencia, principalmente de las células guarda de los estomas, y en la transición del oxígeno durante la fotosíntesis (George & de Klerk, 2008).

Los micronutrientes, de forma general, componen proteínas de importancia fisiológica y metabólica, pero también intervienen en la síntesis de clorofila y formación de cloroplastos, así como en la expresión génica (George & de Klerk, 2008) y estos elementos son:

- ✿ Manganese (Mn): se le atribuye actividad similar al magnesio; sin embargo, su rol se encuentra en la formación de metaloproteínas de la respiración y la fotosíntesis, requerida para la actividad de algunas enzimas y para el mantenimiento de la estructura del cloroplasto (George & de Klerk, 2008).
- ✿ Zinc (Zn): es componente de metaloenzimas con diversas funciones, su deficiencia ocasiona la reducción de la actividad enzimática con la consecuente disminución en la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y clorofila, observándose en la planta hojas pequeñas y entrenudos cortos (George & de Klerk, 2008).
- ✿ Boro (B): contribuye en el mantenimiento de la integridad y función de la membrana plasmática, intervienen en el metabolismo de ácidos fenólicos y como co-factor en la biosíntesis de lignina, es necesario para mantener la actividad meristemática, su deficiencia inhibe la elongación de la raíz y la síntesis de citocininas (George & de Klerk, 2008).
- ✿ Cobre (Cu): se encuentra unido a enzimas que reaccionan con el oxígeno y en plastocianinas (pigmento que participa en la transferencia de electrones (George & de Klerk, 2008).
- ✿ Molibdeno (Mo): compone varias enzimas como co-factor, su deficiencia puede ocasionar toxicidad ya que el nitrato no es reducido a amonio (George & de Klerk, 2008).
- ✿ Cobalto (Co): interviene en la morfogénesis; sin embargo, no es reconocido como esencial para el desarrollo de la planta (George & de Klerk, 2008).
- ✿ Aluminio (Al) y Níquel (Ni): su actividad no ha sido demostrada a pesar de ser incluidos en algunas fórmulas de medio nutritivo; sin embargo, el níquel puede ser esencial para la transformación de urea en amonio mientras que el aluminio podría ser requerido en el cultivo de helechos (George & de Klerk, 2008).
- ✿ Yodo (I): no es reconocido como esencial, pero su ausencia podría causar una disminución del crecimiento de las raíces (George & de Klerk, 2008).
- ✿ Hierro (Fe): se encuentra en los cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas interviniendo en reacciones de oxido-reducción, es requerido para la formación de los precursores de la clorofila, por lo que su deficiencia puede causar clorosis

en las hojas, además compone proteínas que acarrean electrones en la fotosíntesis (George & de Klerk, 2008).

De forma general, la germinación ocurre en medios con bajas concentraciones de fosfatos; sin embargo, existe preferencia por determinadas variantes de concentraciones de sales dependiendo de la especie, o incluso la inhibición de la germinación. La adición de ácidos como el tartárico, cítrico, málico e incluso el jugo de tomate y piña ayudan a estabilizar los iones de hierro, evitando la clorosis del tejido debido a una deficiencia de hierro; utilizar de 50 a 100 ppm de manganeso en el cultivo de orquídeas induce el desarrollo y crecimiento, produciendo raíces, por otro lado el potasio adicionado en altas concentraciones o por un largo periodo de tiempo inhibe el proceso de germinación (Arditti, 1967).

Se reconoce la importancia de la fuente de nitrógeno utilizada y su concentración para la germinación *in vitro*, ya que puede estimular la germinación o inhibirla, por lo general, se utilizan iones nitrato o amonio como fuentes de nitrógeno necesarias para la germinación en orquídeas, sin embargo, también se pueden adicionar aminoácidos como fuentes de nitrógeno orgánicas que deben ser escogidos de acuerdo a la especie, ya que varían los resultados (Arditti, 1967).

Compuestos orgánicos

Se clasifican en tres grupos: carbohidratos, sustancias hormonales y vitaminas. Frecuentemente también se han adicionado aminoácidos y/o amidas como una fuente de nitrógeno orgánico, obteniendo buenos resultados (Merino, 1987; Rojas et al., 2004), la cantidad en la que se adicionan al medio depende de la especie y el genotipo (Thorpe et al., 2008).

Debido a que el explante no puede elaborar su propio alimento, en la preparación del medio se emplean los carbohidratos como fuente de energía o de carbono, pero también tiene un efecto en el potencial osmótico del medio e intervienen en la expresión génica; la sacarosa es el azúcar más ampliamente usado, sin embargo, también se emplea la glucosa en cultivos de monocotiledóneas, fructosa, lactosa y almidón en otras especies. (Merino, 1987; Rojas et al., 2004; Thorpe et al., 2008).

La sacarosa en el medio inhibe la síntesis de clorofila y por ende la fotosíntesis se ve afectada, esto quiere decir que el crecimiento autótrofo *in vitro* no es factible, por otro lado, la sacarosa es un disacárido que al ser hidrolizada durante el proceso de esterilización en autoclave, o dividida por enzimas, se obtienen los monosacáridos glucosa y fructuosa, por lo que se modifica la composición final del medio y cada uno de ellos puede tomar un efecto promotor o inhibidor dependiendo de la especie y del órgano (Thorpe et al., 2008).

La concentración óptima de sacarosa puede inducir la morfogénesis, pero también se pueden obtener otras respuestas modificando la concentración, obteniendo callo, embriones somáticos, raíces o brotes; sin embargo, si la cantidad de sacarosa es insuficiente o se añaden carbohidratos poco metabolizables por la especie se obtienen raíces delgadas y se ve afectada la asimilación de los iones inorgánicos (Thorpe et al., 2008).

En cuanto a los azúcares y carbohidratos utilizados en el medio de cultivo es destacable la preferencia de ciertas especies por alguna de los diversos azúcares empleados. La galactosa muestra un efecto inhibitorio ya que es un azúcar poco común en las plantas, mientras que los disacáridos como sacarosa, celobiosa, maltosa, lactosa y polisacáridos como el almidón son utilizados por las orquídeas, siendo necesarios los azúcares como fuente de energía para la germinación de semillas de orquídea (Arditti, 1967).

También se pueden adicionar alcoholes hidroxilados como el manitol y el sorbitol al medio de cultivo, no son fuentes aprovechables de carbono para todas las especies vegetales, pero el manitol puede ser agregado como agente para regular el potencial osmótico del medio de cultivo (Thorpe et al., 2008).

Las sustancias hormonales o reguladores del crecimiento o fitohormonas desempeñan un papel esencial en la determinación de las rutas de desarrollo de las células vegetales durante el cultivo *in vitro*. Generalmente los reguladores más ampliamente utilizados son las auxinas, citocininas y giberelinas. El tipo y concentración de fitohormonas a utilizar depende la especie, el tejido u órgano y los objetivos planteados. Por lo general, las altas concentraciones de auxinas favorecen la formación de raíces, mientras que las altas concentraciones de citocininas promueven la regeneración de brotes, si ambas fitohormonas están en equilibrio se produce una masa de células indiferenciadas (callo). Las auxinas más utilizadas son el ácido 3-indolacético (AIA), ácido 3-indolbutírico (AIB), ácido

naftalenacético (ANA), ácido 4-clorofenoxiacético (CPA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (tordon); las citocininas de mayor uso son el N⁶ bencil aminopurina (BA), N⁶ dimetil alil aminopurina (2iP), N⁶ furfuril aminopurina (cinetina) y el N⁶ (4-hidroxi, 3-metil, 2-butenil) adenina (zeatina) (Merino, 1987; Morales-Rubio, Espinosa-Leal, & Garza-Padrón, 2016).

El desarrollo *in vitro* es dependiente de la interacción de las sustancias endógenas y las adicionada al medio, utilizando los reguladores apropiados y en las concentraciones adecuadas se puede propiciar la regeneración, pero, las cantidades de reguladores o sus combinaciones no son las mismas para todas las especies ya que los genotipos de cada especie responden de manera diferente (George & Davies, 2008).

Sin embargo, las auxinas estimulan el alargamiento y división celular, así como la promoción de raíces, el ácido indolacético es la única auxina natural y sus niveles endógenos determinarán las cantidades de auxinas sintéticas o naturales que sean adicionadas al medio de cultivo, esta cantidad se puede determinar por un experimento de dosis-respuesta, por otro lado, las citocininas incentivan la división celular y la formación de brotes, multiplicación de tallos y proliferación de yemas laterales, las citocininas naturales son la zeatina y la isopentamil adenina; las auxinas y las citocininas son empleadas en conjunto generalmente para fomentar el crecimiento y desarrollo (Boeri, 2015).

Las giberelinas también se encuentran en forma natural en las plantas y son promotoras del alargamiento celular, elongación de entrenudo, crecimiento meristemático y la interrupción de la latencia en los embriones (Boeri, 2015).

Las vitaminas son compuestos que normalmente la planta necesita para completar su desarrollo ya que son esenciales como intermediarias y catalizadores metabólicos, y a diferencia de los animales, las producen por sí mismas de acuerdo a sus requerimientos, a pesar de ello son incluidas en medio siendo las más comunes la tiamina (aneurina o B₁), ácido nicotínico (niacina o B₃) y piridoxina (B₆); sin embargo, la única vitamina que ha demostrado tener importancia en el cultivo de células y órganos es la tiamina, algunas otras vitaminas han sido utilizadas debido a que pueden estimular procesos de crecimiento específicos (Merino, 1987; Rojas et al., 2004; Thorpe et al., 2008).

La importancia de la adición de tiamina al medio radica en que esta vitamina es un co-factor en el metabolismo de los carbohidratos e interviene en la síntesis de algunos aminoácidos, pero también pueden adicionarse otras vitaminas como el ácido pantoténico (B₅) que estimula el crecimiento y proliferación de algunos tejidos, ácido ascórbico (C) que previene la oxidación e interviene en la división y elongación celular, Vitamina D (D₂ y D₃) que tienen un efecto regulador, Vitamina E como antioxidante (Thorpe et al., 2008).

En condiciones *in vitro* se ha demostrado que las vitaminas promueven el crecimiento; sin embargo, los requerimientos son variables en las especies de orquídeas. Por otro lado, las hormonas vegetales son reconocidas por promover la germinación y crecimiento en orquídeas, pero también por ser inhibidores del desarrollo de estas plantas; las respuestas son variadas, dependiendo de la concentración y la hormona utilizada, así como la especie (Arditti, 1967).

Complejos naturales

En los principios del cultivo *in vitro* se utilizaban suplementos de composición poco conocida, con el paso del tiempo estos fueron sustituidos por las sales inorgánicas y otras sustancias que se conocieran mejor (Thorpe et al., 2008).

Actualmente, se han empleado para enriquecer los medios de cultivo, frecuentemente como última alternativa después de que todos los ingredientes definidos del medio han fallado en el establecimiento de cultivos de células y órganos; estas complejas sustancias son fáciles de obtener, pero la definición de su composición es muy difícil debido a que se obtienen directamente de la naturaleza, por otro lado, de forma general, contienen aminoácidos, péptidos, ácidos grasos, carbohidratos, vitaminas y promotores del crecimiento en diferentes cantidades. Entre estas sustancias se encuentran el jugo de tomate, de naranja, de zanahoria, el agua de coco, pulpa de plátano, emulsión de pescado, extracto de malta, hidrolizado proteico, extracto de levadura, entre otras (Merino, 1987; Rojas et al., 2004; Thorpe et al., 2008).

La adición de complejos naturales puede ser beneficiosa, promoviendo la germinación y el desarrollo, esto debido a su contenido en azúcares, minerales y reguladores del crecimiento específicos, también es posible que actúen como inhibidores o incluso ser

mortales dependiendo de la cantidad adicionada al medio, así como generar desdiferenciación del tejido (Arditti, 1967).

Materiales inertes y de soporte

Al medio de cultivo se pueden adicionar agentes solidificantes, que son sustancias cuya función es crear un medio de consistencia sólida o semisólida que contribuye en el soporte de los tejidos y órganos inoculados para su posterior desarrollo; además, las sustancias solidificantes reemplazan el suelo como sustrato, brindando una superficie tanto de contacto entre el explante y los nutrientes del medio, como de anclaje de las plántulas desarrolladas. Entre los agentes empleados con mayor frecuencia para solidificar el medio de cultivo se encuentran los agares que, a pesar de no ser fisiológicamente inertes debido a su contenido variable de sustancias inhibidoras o estimulantes del crecimiento, permiten brindar al medio la consistencia adecuada para la regeneración del tejido vegetal y realizar monitoreos. Otros agentes gelificantes son la poliacrilamina y el gel de sílice (silica gel), e incluso papel filtro que sirva como plataforma en medios líquidos (Merino, 1987; Rojas et al., 2004).

Otros compuestos

A los medios de cultivo se les puede adicionar myo-inositol que ha mostrado ser de importancia biológica, ya que al interactuar con los otros componentes del medio retarda la necrosis o promueve la división celular y morfogénesis (Thorpe et al., 2008), adenina o sulfato de adenina que frecuentemente favorece la formación de tallo, bases nitrogenadas (ácido citidílico y guanílico) que promueven el crecimiento de cultivos de callo al igual que el jugo de naranja, el ácido cítrico en conjunto con el ácido ascórbico se emplea para controlar la oxidación en el explante, el ácido málico se emplea para el cultivo de embriones y el carbón activado, en bajas concentraciones, ayuda en la absorción de metabolitos tóxicos o de desecho, que pudieran inhibir el desarrollo, como son compuestos fenólicos y taninos producidos por la planta en respuesta a lesiones ocasionadas por el corte del explante, estos compuestos se oxidan y dificultan el crecimiento *in vitro*, en el cultivo de orquídeas, el carbón activado, ha demostrado ser beneficioso para la germinación y en la formación de raíces, ya que brinda al medio condiciones de oscuridad similares al suelo que propician el enraizamiento de las plántulas de hábito terrestre; también se han adicionado ácidos orgánicos como precursores de aminoácidos. En general no son constituyentes esenciales del

medio, pero en concentraciones altas podrían tener efectos inhibitorios del crecimiento vegetal (Boeri, 2015; Merino, 1987; Roca & Mroginski, 1991; Yam & Arditti, 2018).

Condiciones de incubación

Después de establecido el cultivo de tejidos es necesario mantener condiciones ambientales controladas, como son temperatura, humedad, iluminación, fotoperiodo, entre otros.

De manera natural las plantas experimentan un cambio de temperatura entre el día y la noche; sin embargo, en condiciones *in vitro* no es esencial simular la temperatura del medio natural, pero, por lo general, se emplean temperaturas más elevadas que en condiciones *in vivo*. Por otro lado, la modificación de la temperatura en condiciones *in vitro* puede promover la formación de raíces, brotes o incluso la organogénesis a partir de callo, así como inducir el crecimiento en órganos y semillas que presentaron latencia (George & Davies, 2008).

Muchas especies no tienen requerimientos específicos, pero en la germinación de orquídeas se han observado resultados favorables al mantener una temperatura entre los 20 a los 25°C; sin embargo, el proceso de germinación puede darse desde los 6°C hasta los 40°C o incluso más (Arditti, 1967).

La humedad también juega un papel importante en el desarrollo *in vitro*, siendo el 70% de humedad relativa la recomendada para los cuartos de cultivo, mientras que al interior de los contenedores con el medio va del 98 a 99.5%, por lo que el desarrollo se da en condiciones de alta humedad y el decremento de esta al interior de los contenedores ocasiona la desecación de los tejidos (George & Davies, 2008).

Por otro lado, el crecimiento de las plantas es dependiente de la luz debido a que la energía lumínica se transforma en energía química durante la fotosíntesis, induce el desarrollo de la estructura y forma del individuo en la fotomorfogénesis, la cual no requiere de absorción de energía, y también promueve el crecimiento hacia la fuente de luz o fototropismo. En los cuartos de crecimiento se utilizan fuentes de luz artificial, como son las lámparas fluorescentes que permiten la adecuada iluminación del cuarto sin incrementar la temperatura (George & Davies, 2008).

Los requerimientos de luz son más variables en las semillas de orquídea, influyen la duración, la ausencia o presencia, la intensidad, longitud de onda y la fuente de iluminación, muchas de las especies de orquídeas requieren de iluminación; sin embargo, algunas pueden no requerir de iluminación para germinar o generar raíces, y la intensidad lumínica, al igual que el fotoperiodo, dependen del género de orquídea que serán cultivados (Arditti, 1967; Yam & Arditti, 2018).

El pH es un factor importante para un adecuado desarrollo, ya que encontrarse en los límites óptimos permite encontrar las sales en sus formas solubles, consumir los ingredientes y aditivos del medio que favorecen el desarrollo, tener un efecto en las reacciones químicas (principalmente en las catalizadas por enzimas) y asegurar la gelificación del medio (Thorpe et al., 2008), además está dado principalmente por la composición de sales del medio nutritivo y afecta la germinación de las orquídeas, siendo crítico en los primeros estadios del desarrollo (Arditti, 1967).

Se incluye también la agitación en el caso de medios de cultivo líquidos, esta acción permite el intercambio gaseoso, aumentar el contacto del medio con el explante e influir en el crecimiento y desarrollo. El movimiento puede ser giro-rotatorio para el cual se recomienda de 30 a 40 veces por minuto, oscilatorio de aproximadamente 60 veces por minuto o rotatorio de 1 a 3 rpm (Yam & Arditti, 2018).

Género *Sobralia* Ruiz & Pav.

El género *Sobralia* fue nombrado en honor al botánico Don François Martin Sobral, amigo de Ruiz y Pavon (Morren, 1847).

Las especies de este género se caracterizan por constar de plantas epífitas o terrestres, con tallos alargados y delgados con una o muchas hojas, carecen de seudobulbos pero producen raíces carnosas, la inflorescencia es terminal usualmente desde un grupo de brácteas en forma de cono, de flores consecutivas y efímeras (duración de pocas horas) se forman periódicamente y son de color lavanda, blanco, púrpura o rosa, algunas veces con fragancia, sus sépalos y pétalos son similares y se mantienen abiertos, los pétalos poseen bordes ondulados, y el labelo envuelve la columna y polinios semejando una trompeta, el borde del labelo también es ondulado, la larga y estrecha columna algunas veces es alada en

la punta, la polinización es generalmente realizada por abejas (Hammel, Grayum, Herrera, & Zamora, 2003; Meisel, Kaufmann, & Pupulin, 2014).

Este es un género diverso, ya que cuenta con alrededor de 149 especies (Chase et al., 2015) y se puede encontrar en bosques húmedos desde México hasta Perú, Bolivia y Brasil (Meisel et al., 2014).

***Sobralia macrantha* Lindl.**

Sobralia macrantha es una planta terrestre o litófito que se caracteriza por ser arbustiva alcanzando hasta 6 metros de altura; raíces gruesas, compuestas por un velamen multicapa debajo de la exodermis cortical, la cual consta de células con un denso citoplasma intercaladas con células vacuoladas, además el velamen posee cuerpos fibrosos que retardan la transpiración de la raíz; tallos erectos, agregados, teretes y articulados, las hojas salen de la articulación del tallo y son rígidas, ovaladas o lanceoladas, estrechamente acuminadas y plisadas longitudinalmente, en la base forman una vaina marrón alrededor del tallo y en disposición alterna; inflorescencia terminal, flores muy grandes de 15 hasta 20 cm de diámetro, pocas en cada tallo, solamente una flor por cada tallo se encuentra abierta al tiempo y de corta duración (uno o dos días), con una bráctea semejante a una hoja en la base, pero mucho más pequeña; perianto de color púrpura-rosado, sépalos y pétalos oblongos, pétalos más amplios y en la mitad superior ondulados; labelo muy largo, emarginado formando dos lóbulos ondulados, plano y glabro, forma un tubo alrededor de la columna, con laminillas crispadas y una mancha amarilla en la base del labelo; columna elongada, claviforme, con un diente lateral a cada lado, con la antera en el ápice (Ilustración 15 y 16) (Arditti, 1992; Benzing, Ott, & Friedman, 1982; Curtis et al., 1849; Morren, 1847; Ortho Books, 2005; Rodríguez, 2015).

Las semillas de *S. macrantha* son largas, de color amarillo, el embrión tarda en formarse aproximadamente 152 días desde la polinización y posee un cotiledón rudimentario y no requieren de la presencia de un hongo para germinar, por lo que en 1853 se convirtió en una de las primeras orquídeas comerciales (Arditti, 1992; Meisel et al., 2014).



Ilustración 15: Sobralia macrantha Lind. Tomada de Morren (1847).



Ilustración 16: *Sobralia macrantha* Lindl. Tomada de Curtis et al. (1849).

Clasificación taxonómica

- Clase: *Equisetopsida*
- ↳ Subclase: *Magnoliidae*
- ↳ Superorden: *Liliana*
- ↳ Orden: *Asparagales*
- ↳ Familia: *Orchidaceae*
- ↳ Subfamilia: *Epidendroideae*
- ↳ Tribu: *Sobralieae*

↪ Género: *Sobralia* (Chase et al., 2015; Missouri Botanical Garden, s.f.)

↪ Especie: *Sobralia macrantha* Lindl. (Royal Botanic Gardens, s.f.).

Sinónimos: *Cattleya macrantha* (Lindl.) Beer (sinónimo homotípico), *Sobralia macrantha* var. *alba* Lindl., *Sobralia macrantha* var. *purpurea* Lindl., *Sobralia macrantha* f. *alba* (Lindl.) M. Wolff & O. Gruss (sinónimos heterotípicos) (Royal Botanic Gardens, s.f.).

Nombre común

Atempanxochichocane (náhuatl) que significa *flor que llora al borde del agua* (Rodríguez, 2015).

Distribución

Es una especie nativa de México a Nicaragua (Ortho Books, 2005).

En México se puede encontrar en los estados de Guerrero, Oaxaca, Veracruz, Puebla y Chiapas (Rodríguez, 2015).

Ecología

La época de floración es durante la primavera, pero puede presentarse incluso hasta el mes de julio. Se encuentra en bosques húmedos, por ejemplo en el bosque mesófilo de montaña y algunas selvas tropicales a diversas altitudes (Meisel et al., 2014; Ortho Books, 2005; Rodríguez, 2015).

Estado de conservación

Esta especie no se encuentra enlistada en la Norma Oficial Mexicana 059 bajo alguna categoría de riesgo (SEMARNAT, 2019).

Se encuentra enunciada junto a otras especies de orquídeas en el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES) como una especie que no se encuentra amenazada o en peligro de extinción, pero que su comercio debe ser controlado para evitar colocarla en situación de riesgo (CITES, 2019).

Sin embargo, a pesar de ser cultivada abundantemente en algunas regiones, es extraída en grandes cantidades para su venta ilegal lo que ha ocasionado la disminución de poblaciones naturales (Rodríguez, 2015).

Cultivo in vitro de *Sobralia macrantha* Lindl.

Al realizar la búsqueda de literatura específica sobre el tema en bases de datos como Dimensions, Early English Books Online, EBSCOhost, JSTOR, Latindex, ScienceDirect, Scopus, SpringerLink, Web of Science y Wiley Online Library, no se encontró ninguna referencia que aludiera al cultivo *in vitro* de la especie *Sobralia macrantha* ni de otras especies del género *Sobralia*, tampoco se encontraron referencias de géneros como *Elleanthus*, *Epilyna* y *Sertifera*, pertenecientes a la tribu *Sobralieae*.

Sin embargo, en las bases de datos Directory of Open Access Journals, Google académico, ProQuest, ResearchGate y SciELO, se encontró referencias de dos artículos de cultivo *in vitro* para el género *Sobralia*, cuyo resumen se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Cultivo in vitro de especies del género Sobralia.

Especie	<i>Sobralia klotzscheana</i>	<i>Sobralia macrantha</i>
Explante	Semillas	Secciones de protocormos y plántulas
Medio de cultivo	MS 100%	MS 50%
Aditivos	Jugo de piña Agua de coco	ANA (0.1, 0.5 mg/L) con BAP (0.5, 1.5 mg/L)
Resultados	Porcentaje de germinación mayor en medios de cultivo adicionados con jugo de piña	Mayor número de brotes en ANA (0.5-1.0 mg/L) con BAP (0.5-2.0 mg/L) en 24 días
Autores	(Salazar-Mercado & Orlando-Cancino, 2012)	(González-Márquez, González-Caballero, Pérez y Sosa, González-Olvera, & Chávez-Ávila, 2013)

JUSTIFICACIÓN

Las orquídeas son apreciadas debido a su singular belleza; sin embargo, esto ha causado que sean saqueadas de su ambiente natural para la venta ilegal, ya que en el mercado son demandadas por coleccionistas y público en general. Siendo *Sobralia macrantha* una especie comercial que, si bien aún no se encuentra en alguna categoría de riesgo, es importante establecer el cultivo *in vitro* de esta especie como una alternativa para la conservación de la variabilidad genética o reintroducción en ambientes naturales, así como para seleccionar plantas madre de las que puedan obtenerse explantes de calidad para propagación con fines comerciales y así evitar el saqueo de individuos del medio natural, sin embargo, la germinación asimbiótica y desarrollo de *Sobralia macrantha* ha sido poco estudiada.

HIPÓTESIS

Se ha observado que en otra especie del mismo género la adición de compuestos naturales permite obtener un mayor porcentaje de germinación, por lo que se espera que en los tratamientos propuestos el número de individuos que alcance el estadio de plántula tenga variaciones significativas que permitan determinar la formulación de medio nutritivo y concentración de sales basales y complejo natural más adecuados para la germinación y desarrollo *in vitro* de la especie *Sobralia macrantha*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Inducir la germinación asimbiótica y el desarrollo de plántulas *in vitro* de *Sobralia macrantha*, comparando la formulación de medio nutritivo y concentración de sales basales, así como el complejo natural, para determinar el medio de cultivo óptimo y establecer las bases de la germinación de la especie.

Objetivos particulares

Determinar la concentración (100%, 75% y 50%) de sales inorgánicas y formulación del medio nutritivo (MS y KC) más apropiado para la germinación de semillas de *S. macrantha*.

Comparar el efecto de tres complejos naturales (papilla de frutos mixtos, papilla de frutos tropicales y agua de coco) adicionados al medio de cultivo para promover el proceso de germinación en menor tiempo.

Determinar el jarabe de maíz como fuente de energía es un mejor estímulo que la sacarosa para inducir el desarrollo morfogénico durante el proceso de germinación.

Establecer un protocolo para la germinación de *S. macrantha* que pueda ser utilizado por horticultores.

Elaborar un esquema de la ontogenia de *S. macrantha*, ilustrando los estadios ocurridos durante la germinación, desde la semilla hasta la obtención de plántulas.

MÉTODO

Se realizaron una serie de procedimientos para el establecimiento del cultivo *in vitro* para la germinación de *S. macrantha*, los cuales son mencionados en el diagrama de flujo siguiente (Figura 1) y descritos cada uno de ellos más adelante.

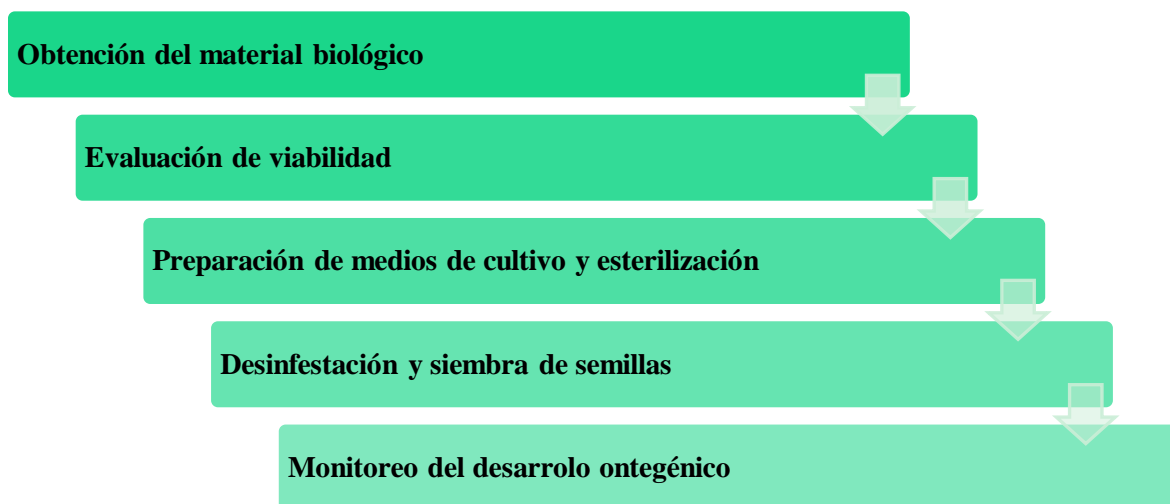


Figura 1: Método general.

Obtención del material biológico

Las cápsulas maduras fueron donadas por El Jardín Botánico Xoxoctic, Puebla. Las cuáles se colectaron a finales del mes de febrero de 2019 y se mantuvieron en sobres de papel para su secado y transporte al laboratorio.

Una vez liberadas las semillas, estas se almacenaron dentro de frascos de cierre hermético con desecador en su interior, colocando las semillas dentro de un sobre de papel encerado el cual se etiquetó con la fecha de colecta y fecha de dehiscencia, especie y clave de acceso al banco semillas de la Unidad de Investigación en Biología Vegetal (UIBV). Para esta especie se asignó la clave *SSOMA* para hacer referencia a que el material ingresado son semillas de la especie *Sobralia macrantha*, seguido del número de cápsula colectada en el sitio.

Evaluación de viabilidad

Para asegurar la obtención de respuesta de las semillas se realizó la evaluación de viabilidad mediante la prueba de Tetrazolio (Anexo 1).

Se tomó una muestra de las semillas previamente colectadas con la punta de una espátula y se depositaron en un sobre de papel filtro, el cual se sujetó con clip, los sobres de papel se colocaron en una caja Petri con agua destilada y se presionaron para extraer el aire.

Posteriormente se desinfectaron las semillas con hipoclorito de sodio al 0.6% manteniendo el sobre en agitación por cinco minutos y se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril.

Los sobres se colocaron en la solución de Tetrazolio (TTC) al 1%, incubándolos por 48 horas en oscuridad.

Transcurrido el tiempo de incubación, se decantó el TTC y se realizaron enjuagues con agua destilada, se retiró el clip y se abrió el sobre con pinzas para dejar expuestas las semillas.

Las semillas se observaron bajo el microscopio estereoscópico, se contaron 25 semillas con embrión y se identificó la cantidad de semillas con el embrión teñido por completo de color rojo. Este paso se realizó en cuatro ocasiones en diferentes campos para obtener el porcentaje de viabilidad.

Medios de cultivo y esterilización

Para el establecimiento del cultivo *in vitro* se utilizaron dos formulaciones de medio: Murashige & Skoog (MS) y Knudson C (KC) (Anexo 2), en concentraciones de sales basales al 100%, 75% y 50%, cada uno adicionado con vitaminas (0.4 mg/L de Tiamina, 0.5 mg/L de Niacina y 0.1 mg/L de Piridoxina), 100 mg/L de Myo-inositol, 5 g/L de Agar-gel como agente gelificante y 2 g/L de carbón activado como antioxidante, el pH se ajustó a 5.7 ± 0.05 en todos los medios de cultivo.

Las fuentes de carbono experimentales fueron sacarosa (Sigma®) y jarabe de maíz (Karo®) (Anexo 3), adicionados en una cantidad de 30 g/L, siendo los tratamientos con sacarosa tomados también como testigos ya que es la fuente de carbono comúnmente utilizada en el cultivo *in vitro* (Figura 2).

Los complejos naturales experimentales fueron papilla de frutos tropicales (Gerber®) y papilla de frutos mixtos (Gerber®) (Anexo 3) adicionados en una cantidad de 20 g/L, y agua de coco (Calahua®) adicionada en 100 mL/L (Figura 2).

Se utilizaron frascos de vidrio de boca ancha como contenedores del medio de cultivo, los cuales se taparon con papel celofán transparente sujeto con una liga a la boca del frasco. Se esterilizaron a 120°C por 15 min a una presión de 1.5 atm.

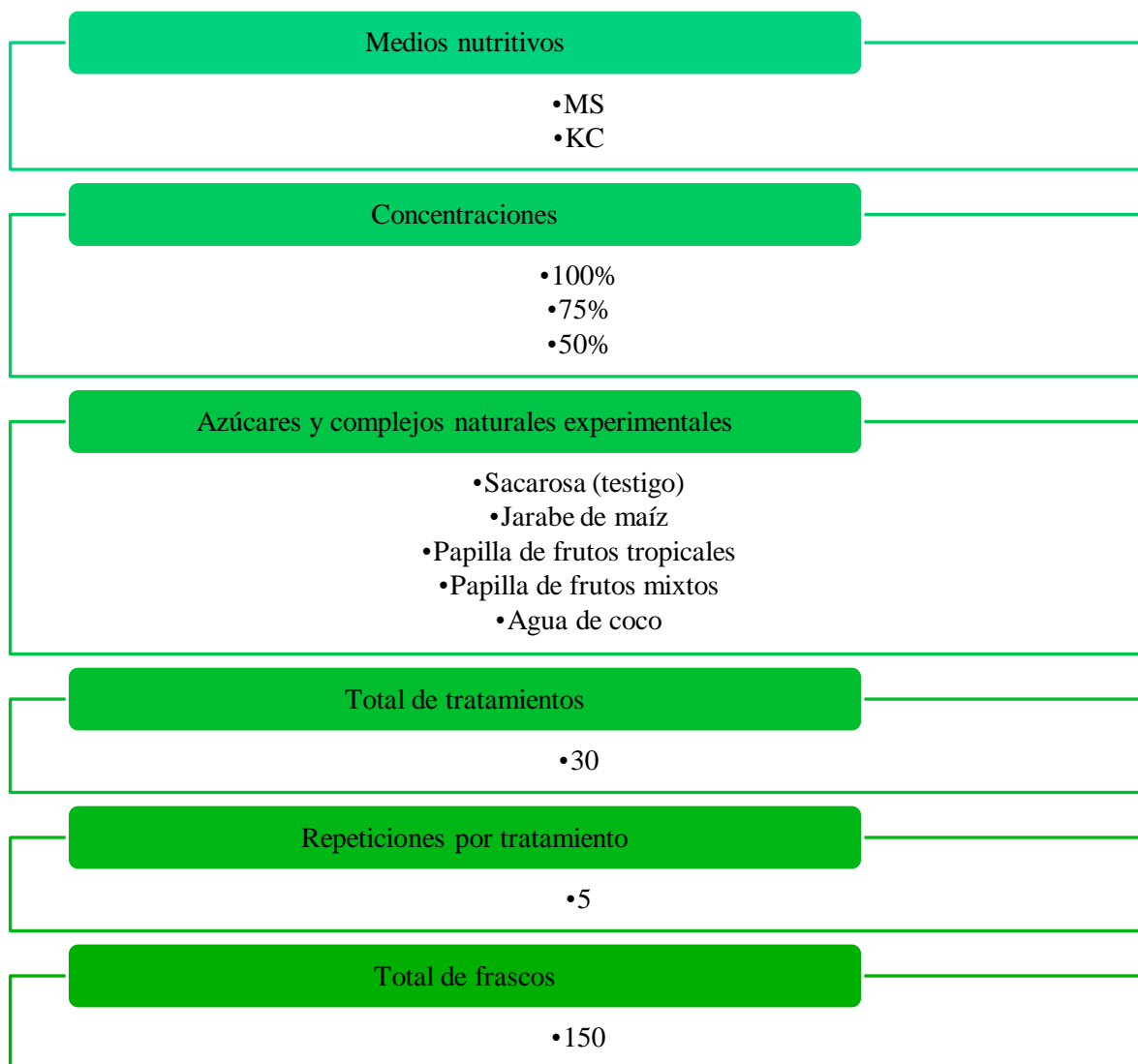


Figura 2: Tratamientos empleados para la germinación asimbiótica de *S. macrantha*.

Desinfestación y siembra

Para la desinfestación del material biológico se colocaron semillas de *S. macrantha* con la punta de un bisturí en sobres de papel filtro asegurados con clips, sumando un total de 150 sobres.

Los sobres se colocaron en una caja Petri con agua destilada y se presionaron con las pinzas de disección para extraer el aire, después se colocaron en un vaso de precipitados con etanol al 70% manteniendo en agitación por un máximo de cinco minutos y se continuo con el procedimiento dentro de la campana de flujo laminar.

Transcurrido el tiempo se decantó el contenido del vaso de precipitados y se agregó hipoclorito de sodio al 0.6%, manteniendo en agitación por 10 minutos, posteriormente se decantó nuevamente el contenido del vaso de precipitados y se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril.

Finalmente se extrajeron los sobres del vaso de precipitados y se colocaron en cajas Petri para comenzar con la siembra.

En la campana de flujo laminar a los sobres se les retiró el clip y se desdoblaron cuidadosamente con ayuda de pinzas de disección previamente esterilizadas, una vez abiertos los sobres se colocaron extendidos sobre el medio de cultivo y se taparon nuevamente los frascos, sellándolos con plástico de cocina autoadherente.

Terminada la siembra los frascos se colocaron en incubación con condiciones controladas, en un fotoperiodo de 16 horas luz por 8 horas de oscuridad, en una temperatura de 25 ± 4 °C y a una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) de $14.5313 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (micromol de fotones).

Monitoreo del desarrollo ontogénico

Se realizaron revisiones periódicamente durante 90 días y una última revisión a los 195 días después del cultivo, para observar los estadios ontogénicos que se presentaron en el proceso de germinación de la especie, además se tomaron fotografías de cada uno de los estadios y se generó un diagrama de la ontogenia de la especie.

La evaluación del desarrollo y germinación se realizó de la siguiente manera (Tabla 2), tomando en cuenta los estadios mencionados por Fracchia, Silvani, Flachslan, Terada, & Sede (2014), Stewart & Kane (2007) y Suzuki, Moreira, Pescador, & De Melo (2012):

Tabla 2: Estadios e índices de desarrollo.

Estadio o Valor	Índice	Descripción
1	100	Semilla sin germinar, testa intacta
2	200	Embrión hinchado y verde, testa rota (germinación)
3	300	Protocormos con meristemo apical o rizoides
4	400	Emergencia de la primera hoja
5	500	Emergencia de la segunda hoja
6	600	Emergencia de tercera hoja y raíz (plántula)

Cálculo del porcentaje de germinación y estadios

Se calculó el porcentaje de individuos en cada estadio a los 6, 18, 25, 32, 39, 46, 56, 81, 90 y 195 días de iniciado el cultivo *in vitro*, utilizando la formula modificada de Menchaca et al. (2011) que se muestra a continuación, donde n es el número de individuos en el estadio evaluado y N el número total de individuos considerados, para cada una de las repeticiones.

$$\% \text{ estadio} = \frac{n}{N} \times 100$$

De la suma de los porcentajes de cada estadio por repetición resultó en el 100% de los individuos evaluados, por lo que realizando la suma de los porcentajes obtenidos del estadio 2 a 6 se obtiene el total de individuos que lograron germinar en cada repetición de los tratamientos evaluados.

$$\% \text{ germinación} = \sum_{x=2}^6 \% \text{ estadio } x$$

Cálculo del Índice de Desarrollo

Los cambios ontogénicos durante el proceso de germinación de semillas de *S. macrantha* se registraron durante 195 días de cultivo en cada una de las repeticiones para calcular el Índice de Desarrollo ontogénico (I.D.) considerando los seis estadios anteriores propuestos.

El índice de desarrollo es utilizado como un indicador del desarrollo ontogénico de los embriones durante el proceso de germinación de las semillas, este se calcula mediante 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 multiplicado por el valor del estadio ontogénico (x), como se observa en la siguiente fórmula propuesta por Harrison & Arditti (1978):

$$I.D. = \sum_{x=1}^6 \left(\frac{e_x}{e} \right) (x) (100)$$

Análisis estadístico

A los datos obtenidos de los registros realizados semanalmente durante los 90 días y el registro final a los 195 días de cultivo para porcentaje de individuos cloróticos y en el estadio más avanzado, porcentaje de germinación y el Índice de Desarrollo durante la germinación se les aplicó un análisis de varianza (ANDEVA) utilizando el programa estadístico computarizado *Statgraphics Centurion XVI* para determinar la existencia de diferencias significativas entre los factores de cada tratamiento empleado.

Adicionalmente, con el mismo programa, se realizó la comparación de rangos múltiples para la identificación de los tiempos donde se presentan cambios, así como las diferencias significativas en el medio nutritivo, concentración de sales y complejo natural empleado.

RESULTADOS

Viabilidad

Mediante la evaluación de la viabilidad por la prueba de Tetrazolio de semillas de *S. macrantha*, pertenecientes a tres lotes distintos (cápsulas de distinta planta madre), se determinó la cantidad de embriones con actividad respiratoria mediante el cambio de coloración de los embriones y, posteriormente, los porcentajes de viabilidad correspondientes para cada uno de los lotes.

El máximo porcentaje de viabilidad se obtuvo en el lote de semillas SSOMA 03 (Gráfico 1), registrando un 80% de embriones teñidos completamente o en su mayoría de color rojo (Ilustración 17).

Siendo las semillas del lote SSOMA 03 aquellas que presentaron condiciones biológicas óptimas para germinar, se sembraron en los diferentes tratamientos propuestos para la evaluación del porcentaje de germinación e Índice de Desarrollo.

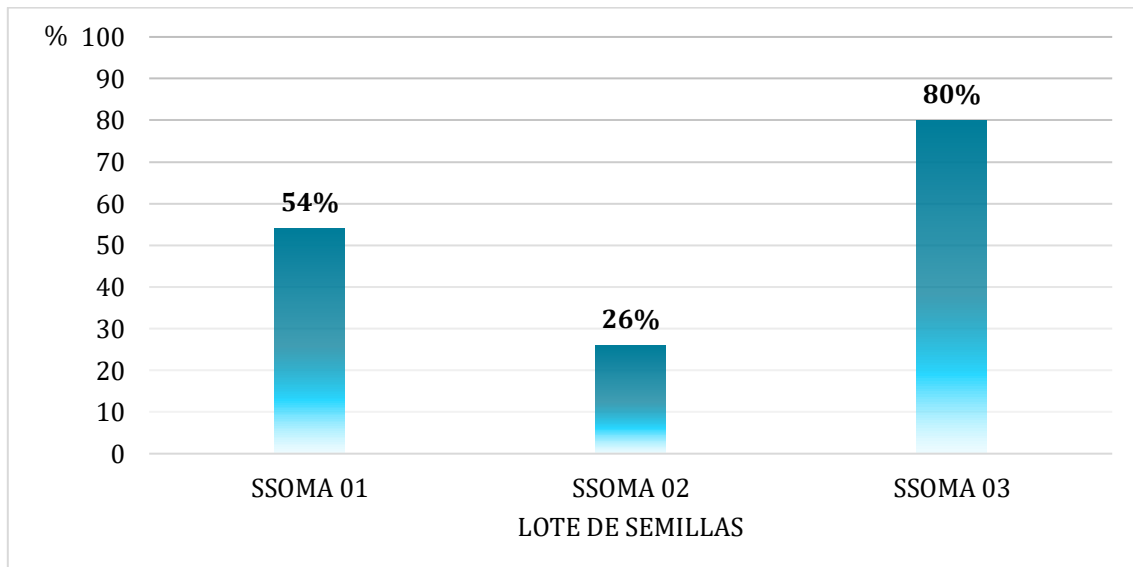


Gráfico 1: Porcentaje de viabilidad de semillas de *S. macrantha* obtenido por prueba de Tetrazolio.

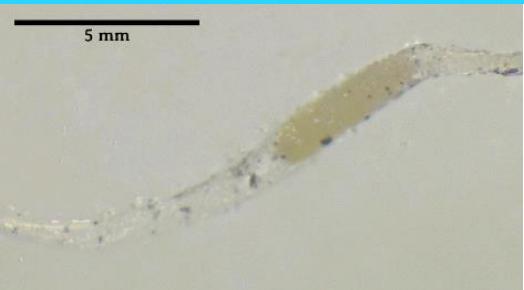
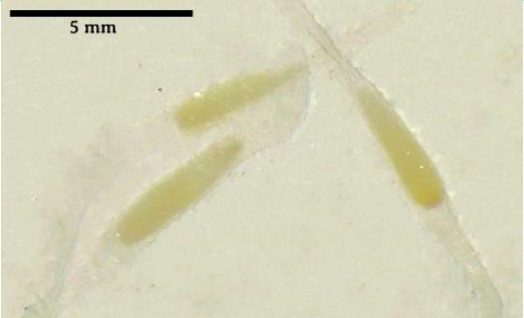





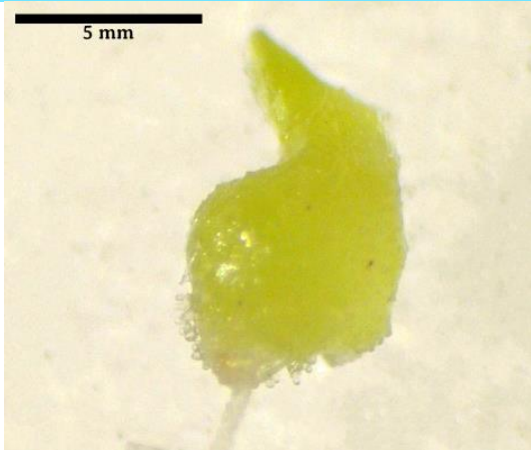
Ilustración 17: Semillas teñidas (viables) en la prueba de Tetrazolio de S. macrantha.

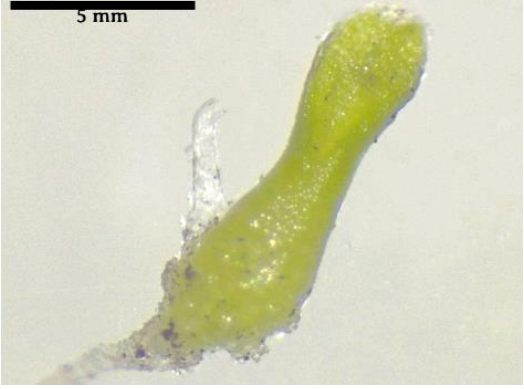



Ontogenia

Durante el monitoreo de los individuos después de su siembra y hasta finalizar los 195 días se identificaron los 6 estadios propuestos anteriormente en todos los tratamientos evaluados, destacando los cambios más notorios durante el proceso de germinación asimbiótica *in vitro* de *S. macrantha*, así como la morfología característica de cada estadio (Tabla 3).

Tabla 3: Estadios de desarrollo de S. macrantha observados durante el proceso de germinación in vitro.

Estadio	Descripción	Fotografía
1	Semilla sin germinar	
1	Embrión hinchado y verde	

2	Rompimiento de la testa (Germinación)	 <p>A micrograph showing a germinating seedling. The seed coat is broken, and a small, green, curved shoot is emerging. A black scale bar labeled "5 mm" is positioned at the top left of the image.</p>
3	Protocormo	 <p>A micrograph of a protocorm, a small, green, oval-shaped structure. A black scale bar labeled "5 mm" is positioned at the top left of the image.</p>
3	Protocormo con rizoides y meristemo apical	 <p>A micrograph showing three protocorms. Each has small, hair-like rhizoids at its base and a distinct apical meristem. A black scale bar labeled "5 mm" is positioned at the bottom right of the image.</p>
3	Proliferación de rizoides y elongación del meristemo apical	 <p>A micrograph of a protocorm showing a significant increase in the number of rhizoids and the elongation of the apical meristem. A black scale bar labeled "5 mm" is positioned at the top left of the image.</p>

4	Emergencia de la primera hoja	
4	Elongación de la primera hoja	
5	Emergencia de la segunda hoja	
6	Emergencia de la raíz	

6	Emergencia de la tercera hoja	
6	Plántula con hojas y raíz cubierta con pelos absorbentes	

Hasta los primeros 6 días transcurridos de haber iniciado el cultivo *in vitro* no se percibieron cambios morfológicos ni de coloración en los embriones.

Sin embargo, para el día 18 en todos los tratamientos se observaron algunos embriones hinchados y con ligeras tonalidades verdes, manteniendo la forma alargada y la testa intacta, por lo que se consideraron aun en estadio 1 o semilla sin germinar. En este mismo tiempo, la mayoría de los embriones presentaron coloración verde en tonos más intensos y adquirieron forma esférica, fragmentaron la testa considerándolos a partir de este momento como individuos en estadio 2 o germinados.

Después de los 18 días de cultivo se apreciaron protocormos de forma ovoide que desarrollaron polaridad, generando en la parte basal (más ancha) rizoides y en la apical (más aguda) el meristemo. El protocormo se alarga en la parte apical o más aguda previo a la emergencia de la primera hoja, que en principio es carnosa y pequeña, pero con el paso de los días se elonga y vuelve más delgada, pero su tamaño final es menor que el de la segunda y tercera hoja.

Transcurridos 46 días de la siembra algunos individuos muestran la segunda hoja emergiendo del centro del protocormo, en posición opuesta a la primera y de apariencia delgada, que se elonga en los días siguientes después de su emergencia, adquiriendo dimensiones mayores a la primera hoja.

La formación de la raíz fue considerada como clave para diferenciar a las plántulas o estadio 6 del resto de individuos observados, siendo 81 días después de la siembra de las semillas cuando se presentó en todos los tratamientos más de un individuo con raíz, la cual se desarrolla rápidamente y presenta pelos absorbentes desde su aparición, encontrándose en menor cantidad hacia la zona de crecimiento de la raíz.

Por otra parte, se destaca la presencia de individuos con un desarrollo morfológico anormal durante el proceso de germinación de *S. macrantha*, principalmente en la transición del estadio 3 al 4, en los cuales el protocormo no mantiene una forma esférica u ovoide y desarrolla varias hojas simultaneas en diferentes puntos de crecimiento, además no completan su desarrollo y se mantienen carnosas y de menor tamaño hasta terminados los 195 días de observación, además se desarrollaron rizoides de forma aleatoria en distintos puntos del protocormo, incluso se formaron muy cerca de la zona de emergencia de hojas y raíces, como se muestra en la Ilustración 18 y 19.

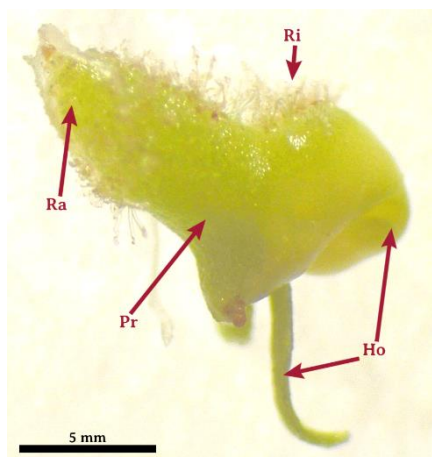


Ilustración 18: Desarrollo anormal de protocormo (Pr) de S. macrantha con rizoides (Ri), crecimiento de dos hojas (Ho) distintas y aparente emergencia de raíz (Ra).

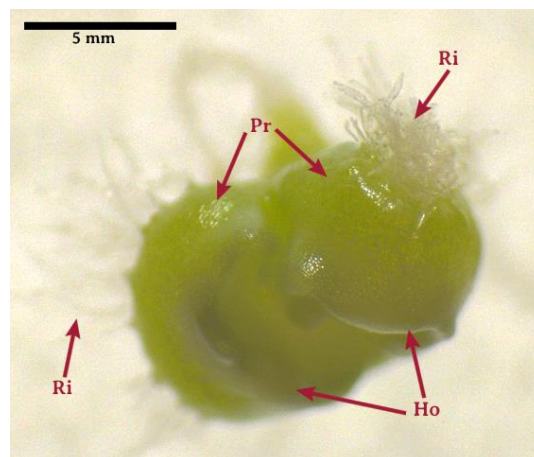


Ilustración 19: Desarrollo anormal de protocormo (Pr) de S. macrantha con rizoides (Ri) en la parte apical y dos hojas (Ho) carnosas poco desarrolladas.

Además, a partir del día 18 se observó la paulatina pérdida de clorofila en algunos individuos del estadio 2 (embrión hinchado rompiendo la testa) al estadio 4 (protocormo con la primera hoja) como se observa en las Ilustraciones 20 y 21, ocasionando la muerte de algunos individuos al finalizar los 195 días.



Ilustración 20: Individuos del estadio 3 (protocormos) con pérdida de clorofila a los 32 días después de la siembra.



Ilustración 21: Individuo del estadio 4 (protocormo con la primera hoja) con pérdida de clorofila a los 39 días después de la siembra.

El análisis de varianza (ANDEVA) del porcentaje de clorosis a los 90 y 195 días después del cultivo mostró el efecto estadísticamente significativo (P-value <0.05) del medio nutritivo, concentración de sales basales y complejos naturales sobre la pérdida de clorofila en los individuos, existiendo diferencias significativas entre ellos (Anexo 4).

Comparando las medias de los porcentajes de tejido clorótico para los días 90 y 195 de evaluación (Anexo 4.1), se evidenció la disminución de los individuos que presentaron tejido con pérdida de clorofila, consecuencia de la recuperación de algunos de estos individuos que les permitió completar su desarrollo, incluso hasta el estadio de plántulas, a pesar de presentar clorosis parcial del tejido a los 90 días; sin embargo, el resto de los individuos no lograron sobreponerse a la clorosis aun después de 195 días (Gráfico 2).

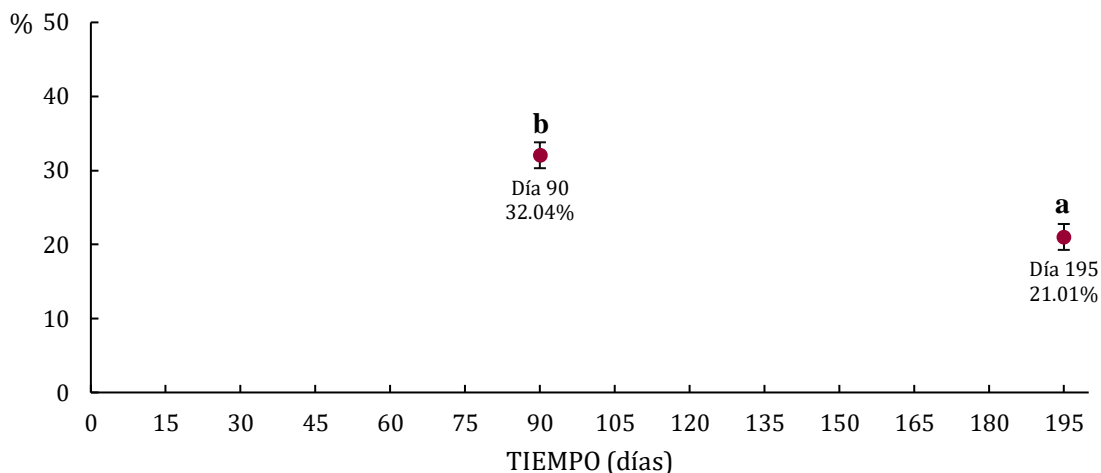


Gráfico 2: Porcentaje de clorosis en el cultivo de *S. macrantha* a los 90 y 195 días de cultivo, independientemente del tratamiento.

En ambos medios nutritivos fue notoria la pérdida de clorofila en el tejido; sin embargo, las diferencias en el porcentaje de individuos cloróticos fueron significativas (Anexo 4.2), en el caso del medio MS se presentó un porcentaje de clorosis superior al 30%, mientras que el medio KC superó escasamente el 20%, indicando que la composición del medio MS presenta características que lo hace menos favorable para el desarrollo de los individuos de *S. macrantha* (Gráfico 3).

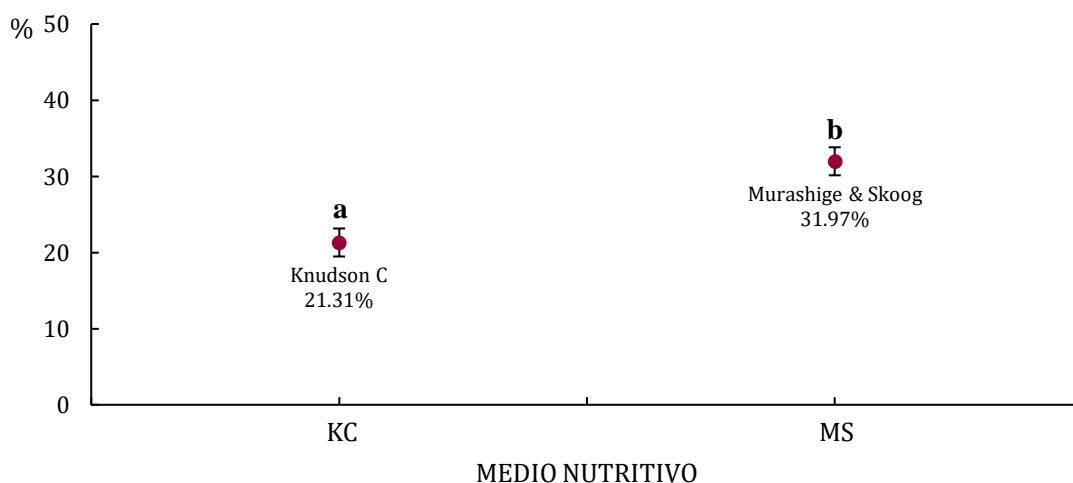


Gráfico 3: Porcentaje de clorosis en el cultivo de *S. macrantha* por medio nutritivo, independientemente de la concentración de sales y complejo orgánico, durante 195 días de cultivo.

En cuanto a la concentración de sales basales, también se observaron diferencias significativas (Anexo 4.3) y la tendencia al incremento del porcentaje de individuos cloróticos conforme se satura el medio de sales, siendo la concentración de 100% de sales inorgánicas la que presentó un mayor porcentaje de clorosis, alcanzando valores superiores al 30%, por el contrario, la concentración más baja evaluada (50% de sales inorgánicas) exhibe un porcentaje menor de individuos con pérdida de clorofila, el cual no excede el 20% (Gráfico 4), estableciendo que la concentración de sales basales juega un papel importante para el desarrollo de los individuos de *S. macrantha* en condiciones *in vitro*.

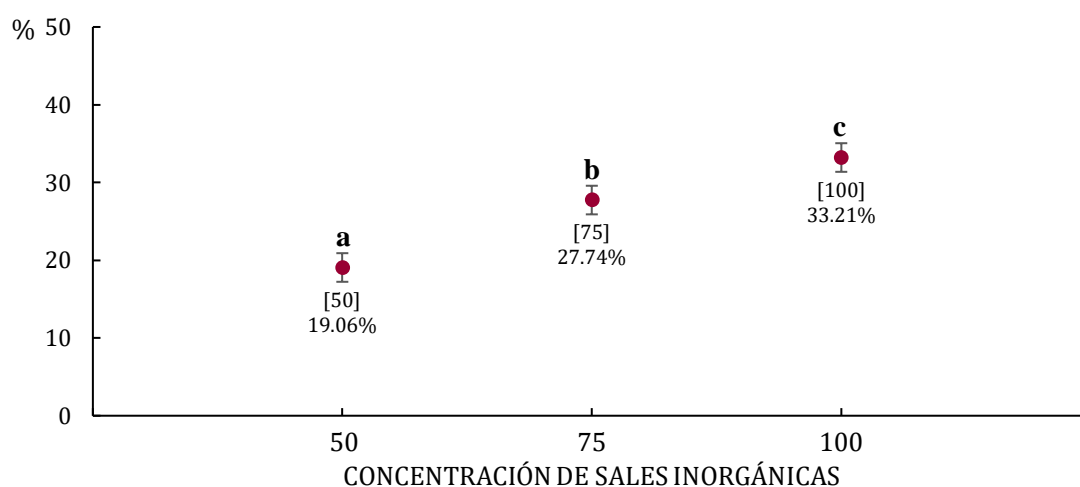


Gráfico 4: Porcentaje de clorosis en el cultivo de *S. macrantha* por concentración de sales, independientemente de medio nutritivo y complejo orgánico, durante 195 días de cultivo.

Finalmente, los complejos naturales evaluados poseen un efecto estadísticamente significativo en el porcentaje de clorosis; sin embargo, este efecto es similar entre los complejos naturales, incluso la sacarosa tuvo un efecto parecido al de los complejos, pero se presentó una diferencia significativa en la cantidad de individuos cloróticos en los tratamientos con jarabe de maíz (mk) como fuente de carbono (Anexo 4.4), este fue el complejo en el cual la cantidad de individuos con pérdida de clorofila no supera el 20% por ello es más favorable para el desarrollo que los demás complejos que sobrepasan el 25% de clorosis (Gráfico 5) y además se le considera como inhibidor de la pérdida de clorofila en el tejido por presentar un menor porcentaje de clorosis que el testigo.

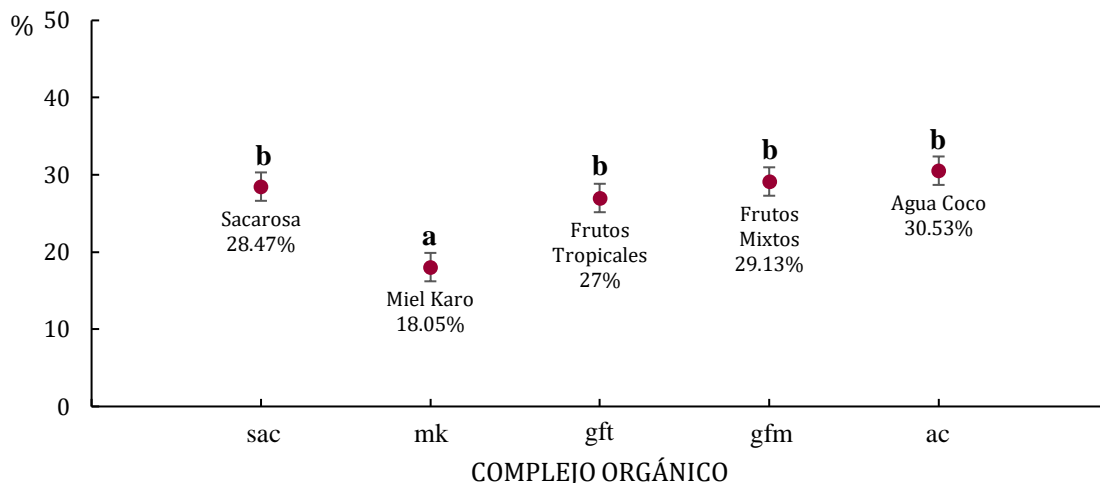


Gráfico 5: Porcentaje de clorosis en el cultivo de *S. macrantha* por complejo orgánico, independientemente del medio nutritivo y concentración de sales, durante 195 días de cultivo.

Germinación de *Sobralia macrantha*

Los datos del porcentaje de germinación obtenidos también fueron sometidos a un análisis de varianza, con el 95% de confianza se demostró el efecto estadísticamente significativo del medio nutritivo, concentración de sales basales y complejos naturales sobre la germinación de *S. macrantha*, así como las diferencias significativas entre los factores antes mencionados (Anexo 5).

Confrontando las medias de los porcentajes de germinación para cada día de evaluación, independientemente del medio nutritivo, concentración de sales basales y complejos orgánicos, se determinó que no hay diferencias significativas después de 18 días de iniciado el cultivo (Anexo 5.1), por lo que el proceso de germinación, entendido como el rompimiento de la testa, ocurre entre los 6 y 18 días después de la siembra, superando el 70% de individuos germinados en este periodo de tiempo, porcentaje similar al obtenido mediante la prueba de tetrazolio (Gráfico 6).

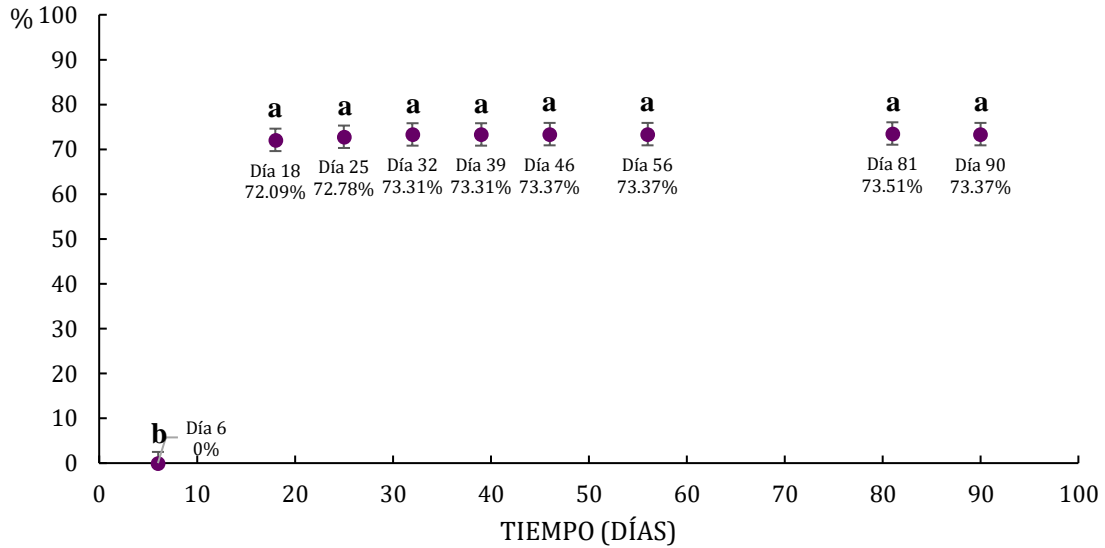


Gráfico 6: Porcentaje de germinación de *S. macrantha* durante 90 días de cultivo in vitro, independientemente del tratamiento.

Los medios nutritivos también mostraron ser significativamente distintos al comparar las medias del porcentaje de germinación (Anexo 5.2), para ambos medios se obtuvo un porcentaje de germinación superior al 60%; sin embargo, el medio KC se exhibió superior al medio MS en el porcentaje de individuos germinados, el primero promueve casi en un 70% la germinación, mientras que el segundo con dificultad excede el 60% (Gráfico 7), por lo que la fórmula del medio KC resulta favorable para inducir la germinación y reducir la clorosis.

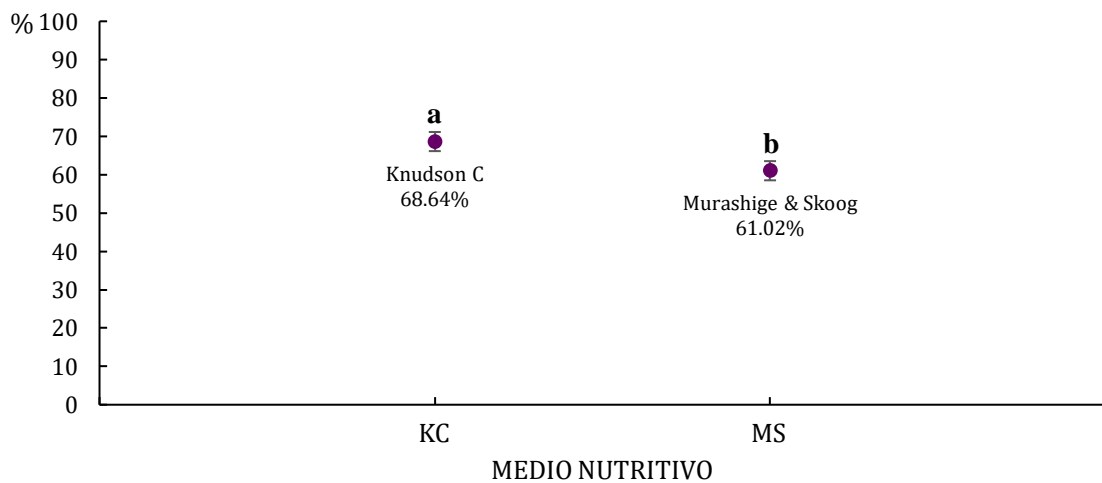


Gráfico 7: Porcentaje de germinación de *S. macrantha* por medio nutritivo, independientemente de la concentración de sales y complejo orgánico, durante 90 días de cultivo.

Referente al impacto de la concentración de sales basales sobre el porcentaje de germinación, se evidenció a la concentración de 100% como diferente estadísticamente de las otras dos concentraciones (Anexo 5.3), y a pesar de presentar el valor más bajo de porcentaje de germinación, supera el 50% de individuos germinados, por lo que puede ser empleada para la germinación de *S. macrantha*; sin embargo, las concentraciones de 50% y 75% de sales promueven la germinación en más de 65% sin ser estadísticamente distintas, a pesar de ser la media del 75% de sales basales ligeramente superior a la de 50% de sales (Gráfico 8), siendo estas dos concentraciones las más favorables para inducir la germinación en condiciones *in vitro*.

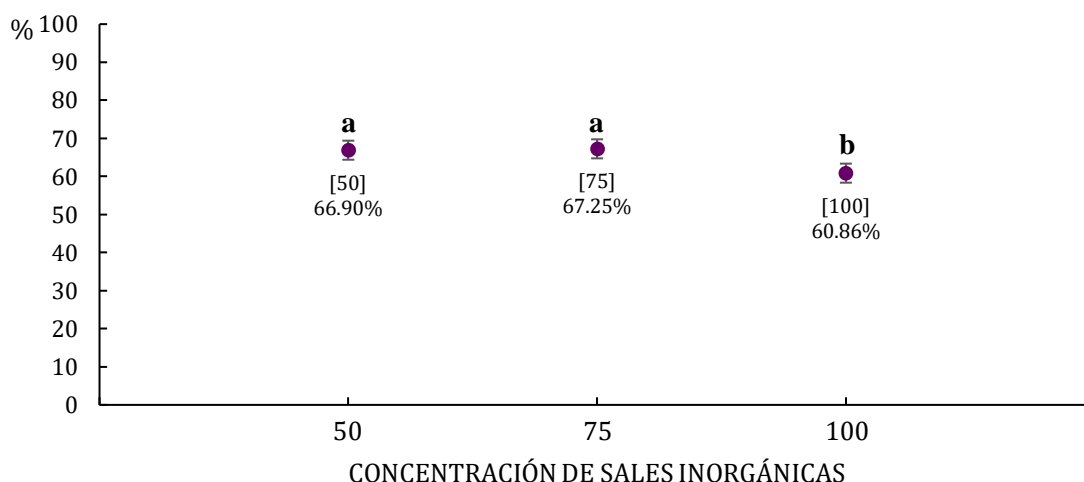


Gráfico 8: Porcentaje de germinación de *S. macrantha* por concentración de sales, independientemente del medio nutritivo y complejo orgánico, durante 90 días de cultivo.

Considerando solamente el efecto de los complejos naturales sobre la germinación no se mostraron diferencias significativas entre el agua de coco (ac) y la papilla de frutos tropicales (gft), tampoco entre la sacarosa (sac) y el jarabe de maíz (mk); sin embargo, estas dos parejas de complejos si fueron significativamente diferentes entre ellos y con la papilla de frutos mixtos (gfm) (Anexo 5.4.), que también fue el complejo natural que mostró una media de porcentaje de germinación mayor respecto a los otros complejos evaluados, prácticamente alcanzando el 70% de germinación (Gráfico 9), promoviendo la germinación de las semillas de *S. macrantha*.

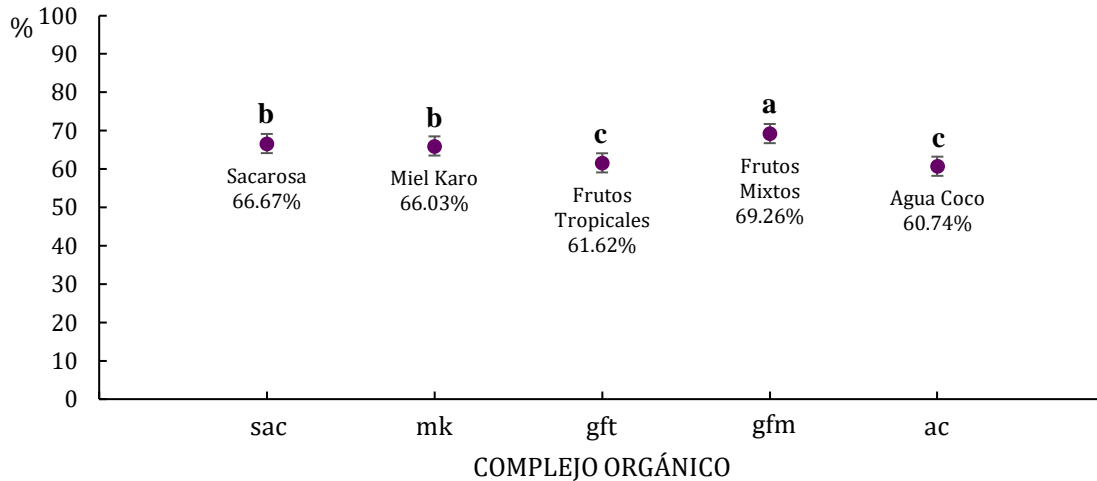


Gráfico 9: Porcentaje de germinación de *S. macrantha* por complejo natural, independientemente del medio nutritivo y concentración de sales, durante 90 días de cultivo.

Índice de Desarrollo de *Sobralia macrantha*

El medio nutritivo, la concentración de sales basales y los complejos naturales utilizados en los tratamientos, tanto para germinación como para desarrollo y crecimiento, tienen un efecto estadísticamente significativo en el I.D. de los individuos de *S. macrantha*, de acuerdo con el análisis de varianza realizado utilizando el 95% de confianza, también se determinó que estos factores poseen diferencias significativas entre ellos (Anexo 6).

Durante los 195 días de evaluación el desarrollo fue continuo, obteniendo plántulas desde el día 90; sin embargo, el índice de desarrollo nos revela que a partir del día 18 la mayoría de los individuos ha roto la testa y se mantiene el desarrollo lento principalmente del día 32 al 56 y del 81 al 90 cuando no se presentaron diferencias significativas (Anexo 6.1), la mayoría de los individuos perduraron en el estadio 2 de embrión rompiendo la testa y es a partir del día 18 cuando se hace notorio un incremento de individuos que pasa a un estadio más avanzado (protocormo) y finalmente para el día 195 la mayoría se encuentra muy próximo al estadio 4 (protocormo con una hoja) (Gráfico 10). En este caso el I.D. muestra que es durante el estadio 2 y 3 es cuando se presenta una reducción del desarrollo debido a la clorosis, por lo que la presencia de plántulas desde el día 90 hasta el 195 no se ve reflejada.

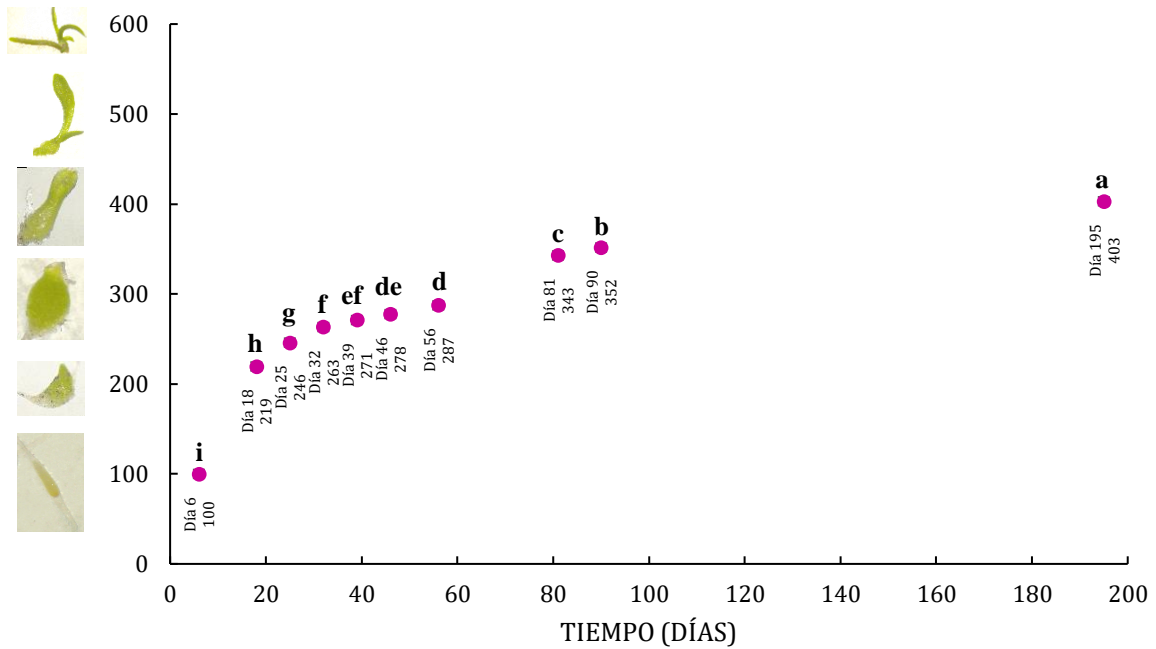


Gráfico 10: Índice de Desarrollo de *S. macrantha* durante 195 días de cultivo, independientemente del tratamiento.

La evaluación del efecto del medio nutritivo sobre el Índice de Desarrollo mostró que existen diferencias significativas entre el medio MS y el KC (Anexo 6.2), siendo el medio KC el que permite obtener un mayor desarrollo de los individuos (Gráfico 11), superando el estadio 4 (protocormo con una hoja) para el día 195, mientras que en el medio MS no se alcanza este mismo estadio, a pesar de que en ambos medios se presentó a los 18 días el cambio de estadio 1 al 2, es evidente que el desarrollo es más rápido en el medio KC desde los primeros días después del rompimiento de la testa (Gráfico 12).

Desde la germinación hasta la obtención de plántulas, el medio KC se muestra superior al medio MS, ya que no sólo fomenta la germinación, sino que además permite que los individuos se desarrollen de manera favorable y algunos de los individuos con pérdida parcial de clorofila en el tejido se recuperen para continuar su crecimiento; sin embargo, no reduce completamente la muerte de individuos por esta misma causa.

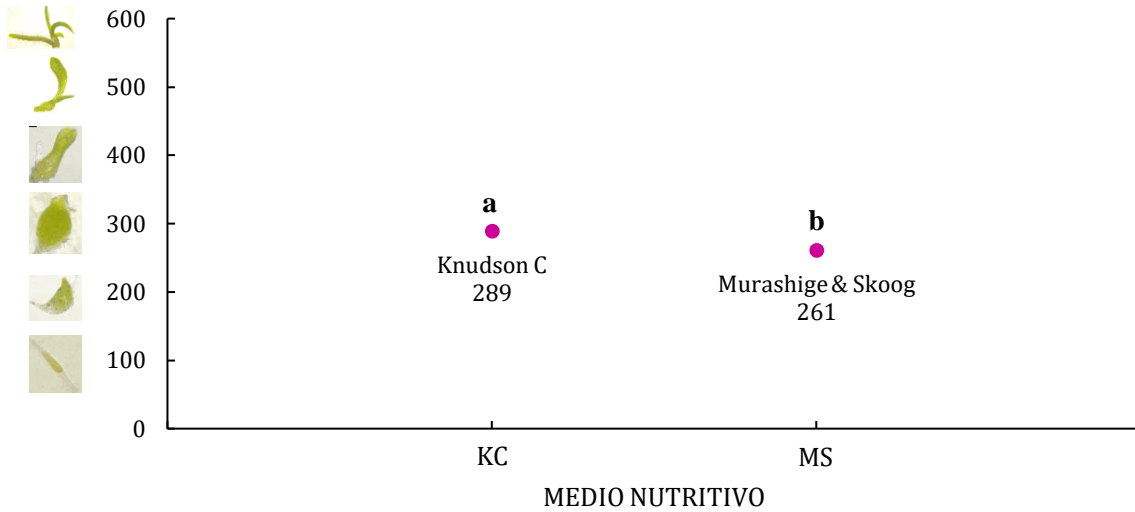


Gráfico 11: Índice de Desarrollo de *S. macrantha* por medio nutritivo, independientemente de la concentración de sales y complejo orgánico, durante 195 días de cultivo.

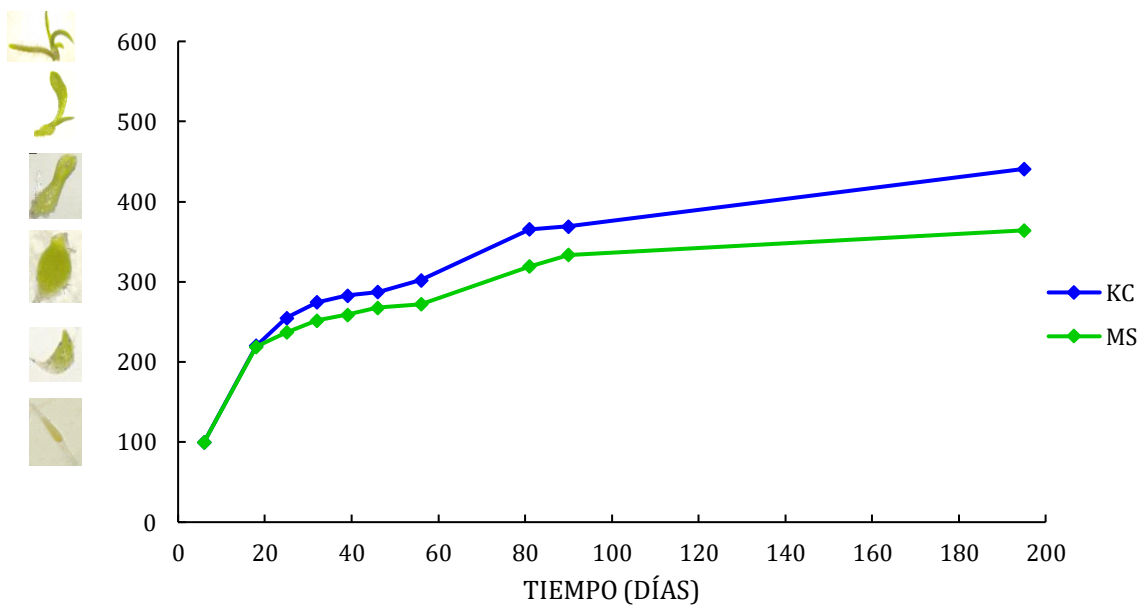


Gráfico 12: Comparación del Índice de Desarrollo de *S. macrantha* a través del tiempo por medio nutritivo, independientemente de la concentración de sales y complejo orgánico.

La concentración de sales basales también es significativamente diferente (Anexo 6.3), mostrando una disminución en el desarrollo conforme aumenta la concentración de sales inorgánicas, por lo cual en el 100% de sales el desarrollo se ve reducido por la pérdida de material vegetal debido al aumento de la clorosis del tejido, por el contrario en 50% de sales se presenta menos clorosis y el desarrollo es mayor que en las otras concentraciones (Gráfico

13); además, la concentración de 100% de sales basales mostró un desarrollo disminuido desde los primeros días de cultivo, que se mantiene hasta los 195 días de cultivo, en comparación con las concentraciones del 50% y 75%, las cuales se observa un desarrollo similar hasta el día 81 donde los individuos que se encontraban en 50% de sales incrementan su desarrollo (Gráfico 14).

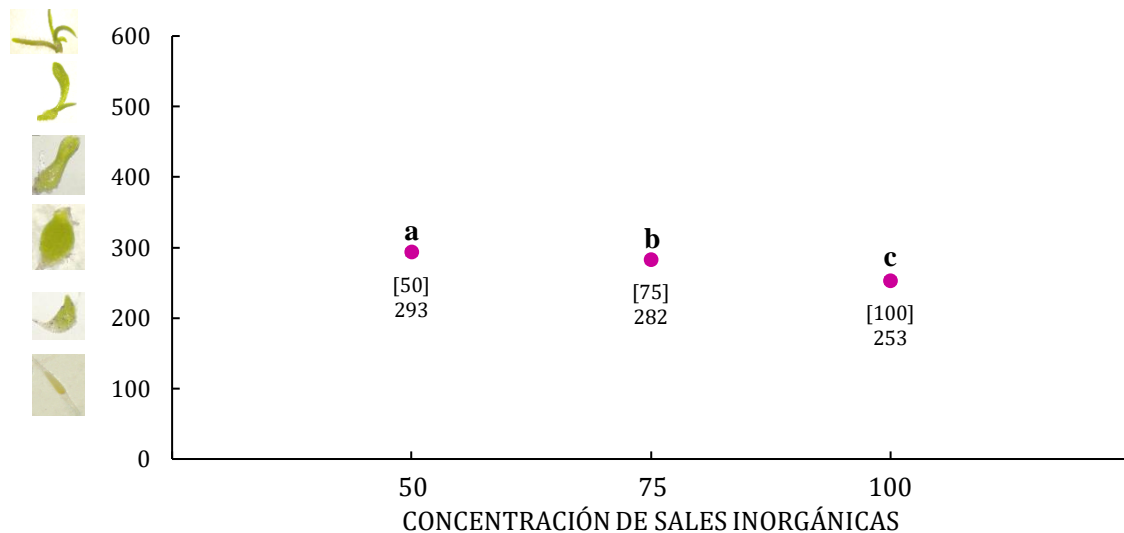


Gráfico 13: Índice de Desarrollo de *S. macrantha* por concentración de sales, independientemente del medio nutritivo y complejo orgánico, durante 195 días de cultivo.

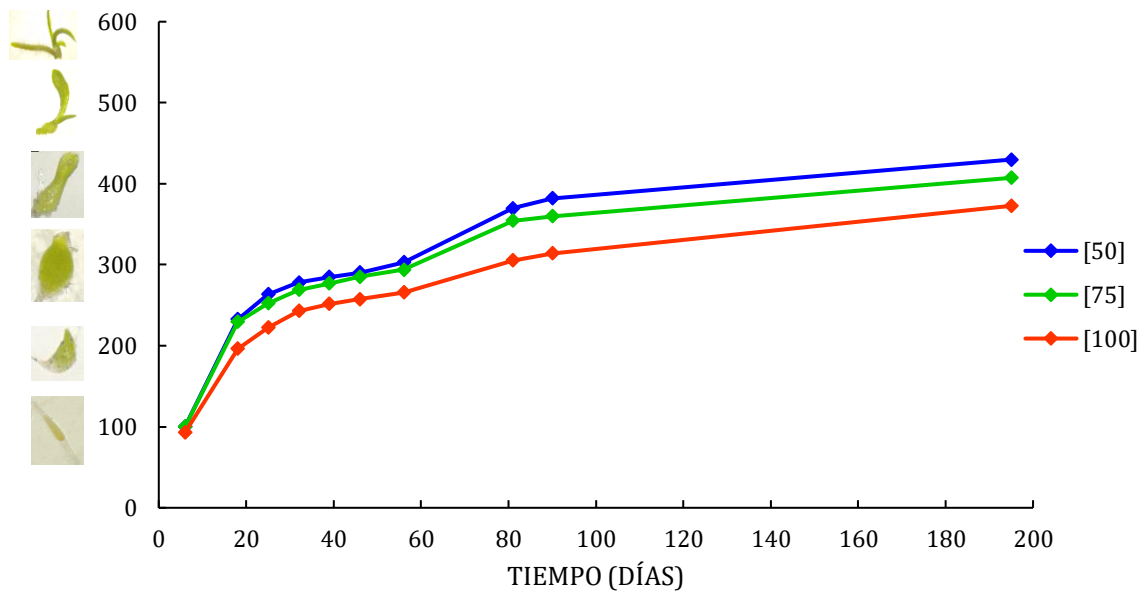


Gráfico 14: Comparación del Índice de Desarrollo de *S. macrantha* a través del tiempo por concentración de sales, independientemente del medio nutritivo y complejo orgánico.

En cuanto a los complejos naturales evaluados se obtuvieron diferencias significativas entre ellos, a excepción de la papilla de frutos mixtos (gfm) y la sacarosa (sac) que muestran un efecto similar (Anexo 6.4), a pesar de ello, fueron complejos que presentaron un mayor Índice de Desarrollo en comparación con el agua de coco (ac) y la papilla de frutos tropicales (gft) que mostraron un desarrollo más lento, por otro lado, el jarabe de maíz (mk) fue el complejo con mejores resultados en la promoción del desarrollo (Gráfico 15), a través del tiempo se observa que el desarrollo es similar en todos los complejos; sin embargo, para el día 195 se distinguen dos grupos, el primero conformado por la sacarosa, la papilla de frutos mixtos y el jarabe de maíz que alcanzaron un índice de desarrollo superior al grupo conformado por el agua de coco y la papilla de frutos tropicales (Gráfico 16).

El jarabe de maíz como fuente de energía durante el desarrollo de *S. macrantha* demostró ser más favorable que los complejos naturales, a pesar de que estos contienen una gran variedad de compuestos que podrían fungir como promotores del desarrollo; sin embargo, no tienen un efecto relevante e incluso podrían considerarse como inhibidores puesto que, en comparación con el testigo, exhiben un menor desarrollo en el mismo tiempo de cultivo.

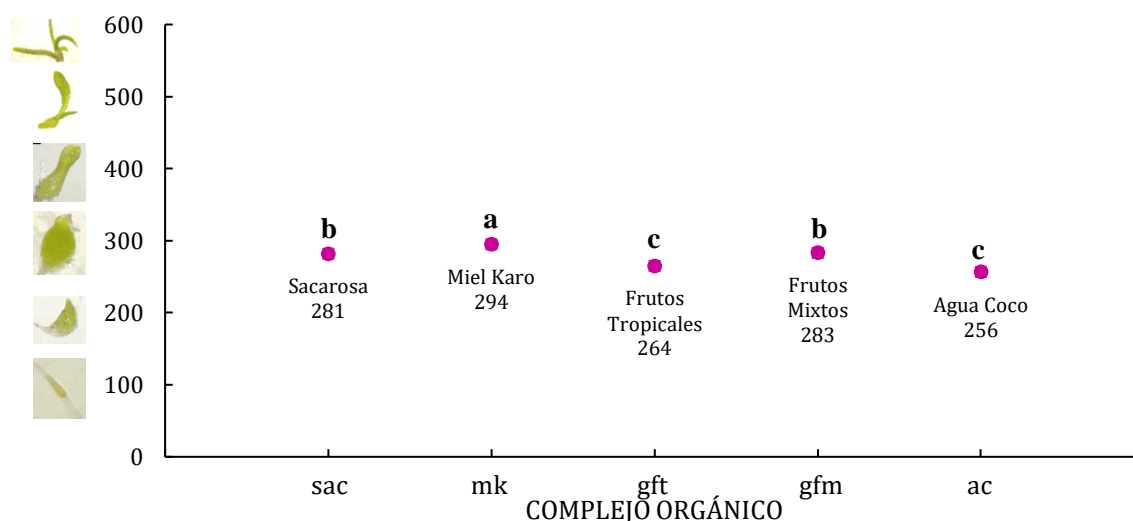


Gráfico 15: Índice de Desarrollo de *S. macrantha* por complejo orgánico, independientemente del medio nutritivo y concentración de sales, durante 195 días de cultivo.

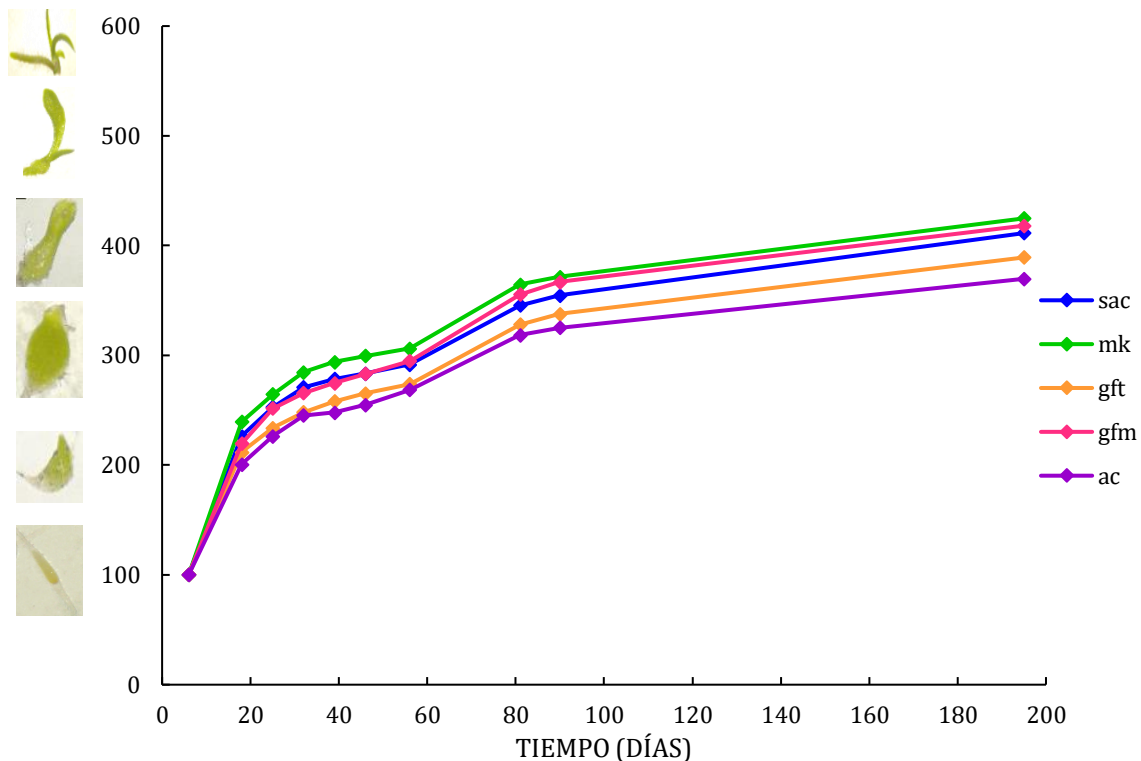


Gráfico 16: Comparación Índice de Desarrollo de *S. macrantha* a través del tiempo por complejo orgánico, independientemente del medio nutritivo y concentración de sales.

Plántulas obtenidas

Se realizó también un análisis de varianza con 95% de confianza con los datos obtenidos a los 90 y 195 días de porcentaje de plántulas, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre el medio nutritivo, la concentración de sales basales y el complejo natural, así como el efecto significativo de estos factores sobre el porcentaje de plántulas resultantes al final de la evaluación (Anexo 7).

Existe una diferencia significativa entre el porcentaje de plántulas obtenidas a los 90 y 195 días después del cultivo (Anexo 7.1), siendo casi el doble de tiempo, se aumentó el porcentaje de plántulas obtenidas de un poco más del 10% hasta un 50%, mientras que el tejido restante no logró completar su desarrollo ya sea por la pérdida de clorofila y consecuente muerte del individuo o que la semilla no inició el proceso de germinación (Gráfico 17); sin embargo, en un plazo de seis meses se obtuvieron plántulas en crecimiento en condiciones de ser transferidas en un medio de crecimiento para alcanzar la talla favorable para su trasplante a condiciones *ex vitro*.

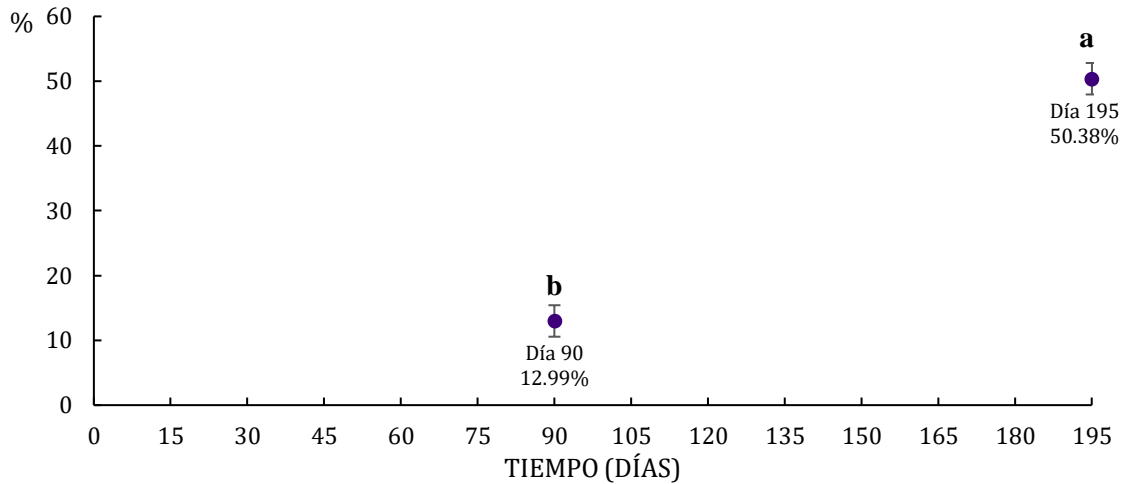


Gráfico 17: Porcentaje de plántulas de *S. macrantha* obtenidas a los 90 y 195 días de cultivo, independientemente del tratamiento.

En cuanto al efecto del medio nutritivo sobre el porcentaje de plántulas obtenidas no se presentaron diferencias estadísticamente significativas (Anexo 7.2), lo que indica que la composición del medio no afecta la obtención de plántulas después de 195 días de cultivo y que además el porcentaje de plántulas es también similar para ambos tratamientos; sin embargo, la media de plántulas obtenidas fue levemente mayor en el medio MS (Gráfico 18).

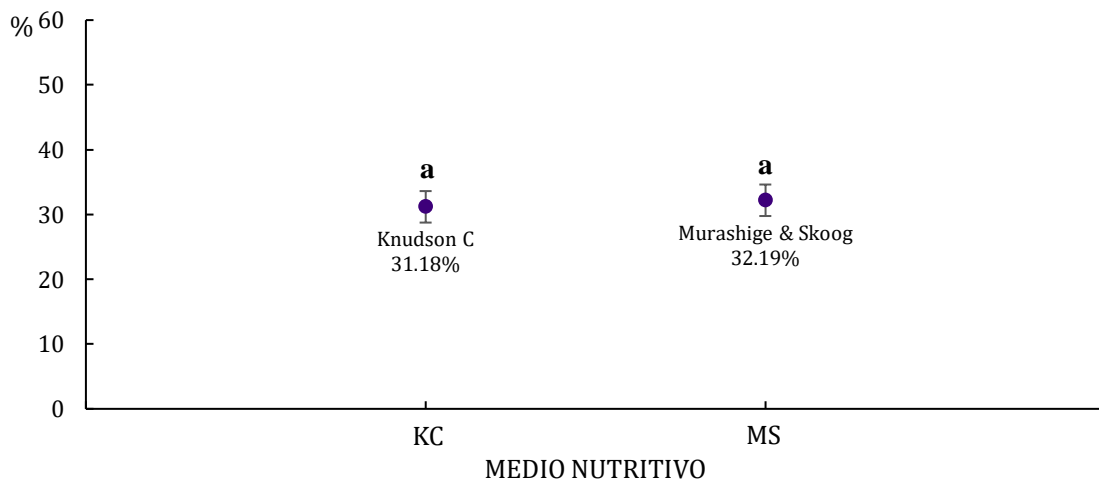


Gráfico 18: Porcentaje de plántulas de *S. macrantha* obtenidas por medio nutritivo, independientemente de la concentración de sales y complejo orgánico, durante 195 días de cultivo.

La comparación de las diferentes concentraciones de sales basales demostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas (Anexo 7.3), exhibiendo, que de forma similar al I.D., la concentración de 50% propicia la obtención de un mayor desarrollo

y en consecuencia un porcentaje de plántulas más elevado, mientras que el aumento en la concentración reduce la cantidad de plántulas obtenidas, relacionado a la disminución anteriormente observada en el I.D. resultado del aumento del tejido clorótico (Gráfica 19).

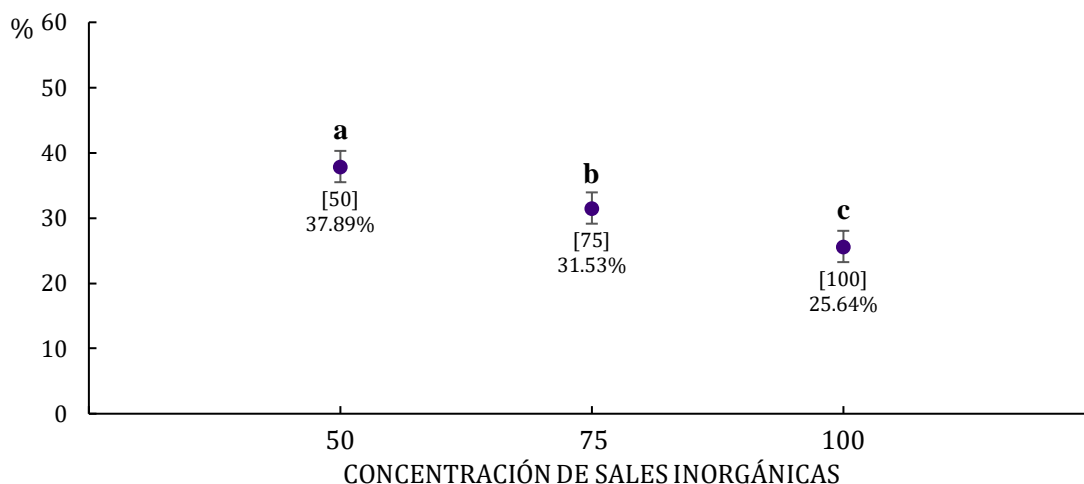


Gráfico 19: Porcentaje de plántulas de *S. macrantha* obtenidas por concentración de sales, independientemente del medio nutritivo y complejo orgánico, durante 195 días de cultivo.

Finalmente, los complejos naturales presentaron similitudes estadísticas en cuanto al efecto observado en el porcentaje de plántulas obtenidas, distinguiendo tres grupos conformados por papilla de frutos mixtos-jarabe de maíz, papilla de frutos mixtos-papilla de frutos tropicales-sacarosa y papilla de frutos tropicales-agua de coco (Anexo 7.4); sin embargo, el jarabe de maíz fue significativamente diferente de la sacarosa, papilla de frutos tropicales y agua de coco, obteniendo una media del porcentaje de plántulas obtenidas superior, cercano al 40%, por lo que es el complejo que favorece el desarrollo en comparación con los otros complejos orgánicos evaluados e incluso superior como fuente de energía en comparación de la sacarosa, considerando al jarabe de maíz como promotor del desarrollo de *S. macrantha* en condiciones *in vitro* (Gráfico 20).

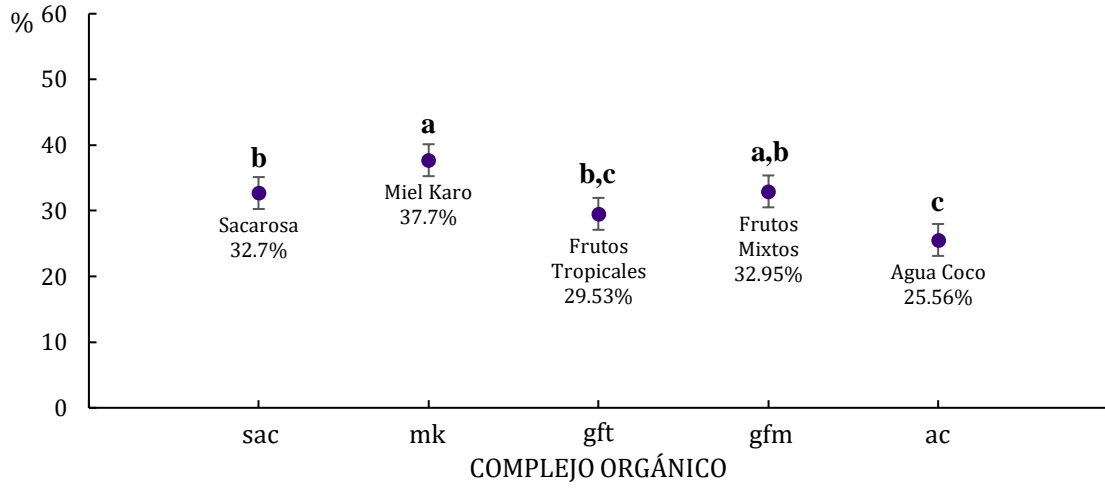


Gráfico 20: Porcentaje de plántulas de *S. macrantha* obtenidas por complejo natural, independientemente del medio nutritivo y concentración de sales, durante 195 días de cultivo.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Evaluar la viabilidad mediante la prueba de Tetrazolio permite identificar rápidamente los embriones con actividad metabólica, principalmente respiratoria, mediante un cambio de color ocasionado por la reducción del tetrazolio (Pérez & Pita, s.f.), esto permitió reconocer visualmente los embriones teñidos o con actividad respiratoria que serían capaces de germinar al brindarles las condiciones ambientales requeridas y contabilizarlos para poder obtener un porcentaje de viabilidad.

El método de la prueba de tetrazolio es de utilidad para evaluar la viabilidad de *Sobralia macrantha*, puesto que al comparar el porcentaje de germinación obtenido de forma directa y el resultado de la prueba de viabilidad por TTC se obtuvieron cifras semejantes, difiriendo en no más de un 10% ocasionado probablemente por el almacenamiento de las semillas durante más de un mes después de la evaluación por TTC, puesto que las semillas mantienen la viabilidad por un periodo de tiempo que varía desde unos días hasta años dependiendo de la especie (Pérez & Pita, s.f.), lo que también indica que las semillas no se encontraban en latencia al momento de realizar la prueba de tetrazolio y tampoco al momento de realizar la siembra, así como la facultad de las semillas de *S. macrantha* de ser almacenada por varias semanas sin verse comprometida en más de un 50% su capacidad de germinar.

Por otra parte, una vez que las semillas han sido colocadas en un medio que proporcione el ambiente favorable para su germinación comienza la formación de estructuras particulares, como es el protocormo en el caso de las orquídeas, se considera que las células de este se encuentran preprogramadas con sus destinos, ya que la zona meristemática se forma en el ápice, mientras que las células parenquimáticas de la base alojan al hongo simbiote (Yeung et al., 2018), para este estudio se observó la formación del protocormo después del rompimiento de la testa, con la posterior diferenciación de zona meristemática en el ápice del protocormo y en la zona basal se formaron rizoides, los cuales son sustituidos por la raíz después de la emergencia de la segunda hoja.

Yeung et al. (2018) también menciona que el meristemo apical de tallo se inicia en la capa meristemática del extremo del protocormo, después la zona meristemática comienza la formación del primordio foliar, coincidiendo con las observaciones realizadas, puesto que al

formarse el protocormo e identificar la zona apical con una pequeña protuberancia se observó la transformación de esta en la primera hoja en los días posteriores.

La primer hoja se observó distinta de las siguientes, esto debido a que Arditti (1992) menciona que el embrión de *S. macrantha* cuenta con un cotiledón rudimentario por lo que su desarrollo resulta en la primer hoja de apariencia carnosa en los primeros días y que posteriormente se adelgaza y elonga ligeramente; además, se mantiene envolviendo a la hojas siguientes sin llegar a alcanzar el mismo tamaño de éstas, que desde el comienzo son delgadas y crecen rápidamente después de su emergencia.

Después del desarrollo y crecimiento de las hojas se forman las raíces, culminando así el proceso de germinación con la formación de plántulas que continúan su desarrollo y crecimiento *in vitro* hasta alcanzar la talla adecuada para ser aclimatizadas en condiciones *ex vitro*.

Sin embargo, durante el proceso de germinación se presentó desarrollo morfológico anormal en algunos individuos de forma aleatoria en todos los tratamientos, este resultado se relacionó con factores principalmente genéticos como pueden ser defectos en el material genético de los embriones, siendo que se utilizaron semillas de plantas madre provenientes de medio natural para establecer el cultivo *in vitro*, Abdelnour-Esquivel & Escalant (1994) señalan que la descendencia de las semillas no son clones de la planta madre seleccionada, por lo que hay variaciones genéticas entre los individuos, pudiéndose encontrar fallas en el material genético en algunos de los embriones.

Pero tampoco se descartan otras causas, como podría ser una exposición prolongada a hipoclorito de sodio durante la desinfección que afectara al embrión para germinar y crecer de forma normal como menciona Velázquez Barrón & Fuentes Dávila (2009) o la presencia de sustancias provenientes de los compuestos naturales evaluados debido a que Arditti (1967) hace alusión a la composición poco conocida de estos aditivos; ya que, poseen reguladores de crecimiento, vitaminas, aminoácidos, azúcares y demás sustancias como terpenoides y flavonoides que podrían tener un efecto tanto estimulante como inhibitorio de la germinación; así como, causar la alteración del desarrollo normal de los individuos, dependiendo de la especie evaluada.

Otro efecto observado durante el proceso de germinación de *S. macrantha* fue la pérdida de clorofila en el tejido de los individuos en los primeros estadios; sin embargo, en el transcurso de los 90 a 195 días se redujo el porcentaje de clorosis de un 10%, esta recuperación pudo deberse a que individuos con pérdida parcial de clorofila lograron resistir y las células aun funcionales regeneraron el tejido clorótico permitiendo el desarrollo del individuo hasta el estadio de plántula, de acuerdo con el principio de totipotencialidad celular, que nos indica que cada célula del individuo contiene material genético similar que le permite generar células idénticas a ellas que puedan diferenciarse posteriormente para regenerar al individuo (Portillo & Santacruz-Ruvalcaba, 2004), por otra parte, Yeung et al. (2018) hacen referencia a la escasa diferenciación celular de los embriones de orquídea y la rápida proliferación celular que se da en los primeros estadios de desarrollo cuando se forma el protocormo con el protomeristemo; por lo que, los individuos del presente estudio se encontraban en etapas del desarrollo favorables para la regeneración celular y recuperación del tejido dañado.

Martínez-Villegas et al. (2015) hace referencia a la clorosis del tejido como una respuesta ante concentraciones altas de sales minerales que reduce el potencial osmótico del medio de cultivo dificultando la absorción de agua y nutrientes por el explante; sin embargo, también menciona que concentraciones demasiado bajas de sales minerales en el medio ocasiona la insuficiencia de macro y micronutrientes, resultando, igualmente, en un crecimiento poco adecuado, por lo que es importante encontrar la concentración óptima de sales basales que permita la adecuada hidratación y suministre los nutrientes requeridos para el desarrollo y crecimiento adecuado de los individuos, respuesta observada en los tratamientos de medio MS que como se observa en el Anexo 2 no sólo contiene una abundante cantidad de cada una de las sales empleadas sino también mayor diversidad de ellas en comparación con el medio KC que podría considerarse simple; no obstante, la concentración de sales basales también es importante debido a que se observó que a medida que ésta aumenta, también lo hace la cantidad de individuos cloróticos resultantes del estrés hídrico ocasionado por un potencial osmótico inadecuado, por lo que se recomienda utilizar un medio reducido en sales al 50% de su concentración para reducir la pérdida de clorofila durante la germinación de *S. macrantha*.

Pierik (1990) y Arditti (2008) aseguran que los azúcares añadidos al medio de cultivo tienen una mayor influencia sobre el potencial osmótico que las sales minerales, siendo la sacarosa el azúcar comúnmente empleado en el cultivo *in vitro*, éste se descompone por hidrólisis en glucosa y fructuosa, modificando así también el potencial osmótico; sin embargo, reducir la cantidad del azúcar ocasiona la reducción de carbonos disponibles para la asimilación por los individuos, afectando el crecimiento celular, regeneración de brotes y formación de raíces como señala Thorpe et al. (2008), por lo que la clorosis en el tejido también pudo ser causada por una alteración del potencial osmótico debido a la saturación de azúcares en el medio de cultivo proveniente de la adición simultánea de sacarosa y los complejos naturales evaluados, siendo el jarabe de maíz el complejo que mostró menor alteración del potencial osmótico permitiendo que el porcentaje de clorosis fuera menor que en los demás complejos y la obtención de una mayor cantidad de plántulas de *S. macrantha* al finalizar los 195 días de cultivo.

Referente a la germinación de *S. macrantha*, Yeung et al. (2018) mencionan que este proceso en las orquídeas terrestres es un poco más complicado que en las especies epífitas, debido a que las semillas de algunas orquídeas terrestres requieren de un tratamiento de estratificación para liberarlas de la latencia; ya que, la cubierta o testa está fuertemente lignificada haciéndola impermeable, o también se encuentran sustancias endógenas inhibitorias; sin embargo, para *S. macrantha* no fue necesario aplicar pretratamientos para obtener, después de dos semanas de iniciado el cultivo, más del 50% de germinación en los medios nutritivos, concentraciones de sales basales y complejos naturales, a pesar de presentarse diferencias significativas entre cada uno de ellos.

El medio MS es el usado comúnmente en el cultivo de tejidos vegetales ya que la mayoría de especies de plantas han tenido una respuesta favorable (Pierik, 1990); sin embargo, existen otras formulaciones de medio utilizadas para el cultivo *in vitro* de orquídeas, una de ellas es el medio KC (Knudson), en comparación, este último posee una menor variedad de sales y en concentraciones menores que el medio MS, la cantidad total de nitrógeno también difiere en gran medida de 60 mM que posee el medio MS a 16 μ M del medio KC (Park & Yeung, 2018), por lo que se establece que la germinación de *S. macrantha* se ve estimulada en un medio de cultivo simple, tanto en composición como en

concentraciones de sales, coincidiendo con Pierik (1990) quien relaciona mejores resultados en el cultivo de orquídeas terrestres en medios pobres en sales.

El utilizar aditivos naturales puede ser positivo para la germinación y el desarrollo de la plántulas; además, se encuentran disponibles en fuentes comerciales, algunos de los compuestos naturales utilizados para el cultivo de orquídeas son agua de coco, extracto de papa, savia de arce, peptona, carbón, chitosán (quitosano) y papillas de plátano, papaya, papa o tomate (Park & Yeung, 2018), en *S. macrantha* se confirmó que uno de los aditivos promueve un mayor porcentaje de germinación en comparación con los tratamientos que contienen solamente la fuente de carbono, por consiguiente se propone como aditivo para promover la germinación de esta especie la papilla de frutos mixtos que se compone en su mayoría por puré de mango y manzana, mientras que los otros dos aditivos mostraron una actividad inhibitoria de la germinación, ya que el porcentaje de germinación fue incluso menor que en el tratamiento testigo, siendo el agua de coco el aditivo menos recomendado para la germinación de *S. macrantha*, coincidiendo con los resultados obtenidos por Salazar-Mercado & Orlando-Cancino (2012) con *Sobralia klotzscheana* cuya germinación también se vio inhibida en presencia de agua de coco.

El medio inicial que es adecuado para la germinación algunas veces requiere ser sustituido por un medio más complejo en composición para el posterior desarrollo de las plántulas (Yeung et al., 2018), concordando con las comparaciones realizadas entre los medios nutritivos, concentraciones de sales basales y complejos naturales evaluados para el porcentaje de germinación e índice de desarrollo, siendo el medio nutritivo KC al 50% o 75% de su concentración de sales basales y adicionado con papilla de frutos mixtos el medio de cultivo adecuado para la germinación; mientras que, para el desarrollo de los individuos reducir al 50% la concentración de sales inorgánicas, excluir el complejo natural inicial y cambiar la fuente de energía original (sacarosa) por jarabe de maíz resulta ser más favorable para la obtención de plántulas.

En cuanto al Índice de Desarrollo ontogénico se apreciaron diferencias en el desarrollo de los individuos a través del tiempo; sin embargo, en ningún momento se apreció que los individuos alcanzaran el estadio de plántula, esto debido a que el porcentaje de individuos no germinados y de clorosis en los estadios 2, 3 y 4 ocasionó la disminución de los valores del

índice de desarrollo a pesar de encontrarse el resto de los individuos en estadio de plántula, ya que el porcentaje de individuos en estadios 1 a 4 en suma es mayor al porcentaje final de plántulas obtenidas a los 90 y 195 días. A pesar de la clorosis del tejido, la cantidad de plántulas se incrementó con respecto al tiempo, por lo que al día 195 la mitad de los individuos colocados para su germinación completan su desarrollo, manteniéndose en una fase de crecimiento para ser transferidas a condiciones *ex vitro* posteriormente.

Sin embargo, se destaca que en el medio KC no sólo propicia la germinación, sino que favorece el desarrollo de los individuos en los días posteriores al rompimiento de la testa, hasta alcanzar el estadio de plántula, a comparación del medio MS que se mostró inferior en ambos aspectos, y a pesar de que la cantidad individuos cloróticos en este medio fue superior, se obtuvieron plántulas en un porcentaje similar al del medio KC, pero el medio MS puede resultar favorable para el desarrollo de otras especies terrestres como es *Sobralia klotzscheana* (Salazar-Mercado & Orlando-Cancino, 2012), *Paphiopedilum wardii* (Zeng et al., 2012) o *Bletia purpurea* (Dutra et al., 2008), así como la modificación del medio KC también muestra buenos resultados en la germinación de *Paphiopedilum exstaminodium* y *Paphiopedilum caudatum* (Rodríguez, 2000) y *Habenaria macroceratitis*, cuya germinación se ve prácticamente inhibida en medio MS (Stewart & Kane, 2006).

Por otra parte, la concentración al 50% de sales basales permite que los individuos de *S. macrantha* se desarrollen de mejor manera, puesto que el porcentaje de clorosis también se ve reducido en esta concentración permitiendo que en su mayoría las plántulas fueran obtenidas en esta concentración, así como en el estudio realizado por González-Márquez et al. (2013) con esta misma especie, se demostró que la mitad de la concentración de sales basales del medio MS adicionado con ácido naftalenacético (ANA) y bencil aminopurina (BAP) genera organogénesis partiendo de secciones de protocormo y plántula, por otra parte, la reducción al 50% de sales inorgánicas del medio permite la reducción del tiempo de germinación y promueve el desarrollo de protocormos de *Paphiopedilum wardii* (Zeng et al., 2012) y el desarrollo de los individuos de *Bletia purpurea* hasta plántulas al cabo de 5 semanas (Dutra et al., 2008), mientras que en *Chloraea crispa* induce la formación de callo embriogénico y posteriormente con la adición de bencil aminopurina (BAP) se promueve la generación de protocormos (Quiroz et al., 2017).

En cuanto al complejo natural más favorable para el desarrollo y obtención de plántulas es el jarabe de maíz, que es también un sustituto de la sacarosa como fuente de carbono *in vitro*, coincidiendo también con el complejo en que se presenta menor porcentaje de clorosis, no obstante otros complejos naturales pueden ser promotores del desarrollo como resultó ser el jugo de piña adicionado al medio de germinación y desarrollo de *Sobralia klotzschiana* (Salazar-Mercado & Orlando-Cancino, 2012), el extracto de papa incorporado al medio de crecimiento de *Govenia capitata* permite la obtención de plántulas a pesar de la presencia de individuos cloróticos que en algunos casos lograron recuperar la clorofila y continuar su desarrollo (Padrón, 2006), el agua de coco y pulpa de plátano enriquece los medios de cultivo promoviendo la producción de plántulas de *Paphiopedilum caudatum* y *Paphiopedilum exstaminodium* (Rodríguez, 2000), la adición de triptona o peptona también favorece el aumento del porcentaje de germinación de *Paphiopedilum wardii*, además la adición de agua de coco favorece el desarrollo de los protocormos hasta plántulas mientras que la papilla de plátano suprime la germinación y desarrollo, pero promueve el crecimiento de las plántulas subcultivadas (Zeng et al., 2012).

El jarabe de maíz es obtenido por hidrólisis del almidón y la transformación de la glucosa, por lo que está conformado por un alto contenido en fructuosa (de 42 a 90%) y posee un gran poder edulcorante aprovechado por la industria alimentaria (Gil, 2010), este jarabe como fuente de energía en el cultivo *in vitro* ha resultado favorable debido a que se encuentra en una forma asimilable por la planta, estableciendo que *S. macrantha* se desarrolla de mejor manera en presencia de altos contenidos de fructuosa que en la combinación de fructuosa-glucosa resultado de la hidrólisis de la sacarosa durante el autoclaveado, por otra parte Pierik (1990) menciona que los azúcares intervienen en gran medida en el potencial osmótico del medio de cultivo, y en el caso del jarabe de maíz este mantiene un adecuado flujo de agua y nutrientes del medio hacia el interior de las células de los individuos favoreciendo el desarrollo, y evitando las consecuencias de un inadecuado potencial osmótico, como son la inhibición del crecimiento celular y el impedimento de la regeneración tanto de brotes como de raíces (Preece, 2008).

El cultivo simbiótico con hongos aislados *in situ* y cepas previamente aisladas mostró ser superior al asimbiótico en medio KC, para las especies terrestres *Bletia campanulata*,

Dichromanthus aurantiacus y *Dichromanthus cinnabarinus* (Rangel, 2006), también se ha sustituido el medio de cultivo por un fertilizante inorgánico obteniendo mayor porcentaje de germinación y la generación de PLB's en *Odontoglossum gloriosum* (Pedroza-Manrique & Mican-Gutiérrez, 2006), incluso, realizar un cultivo previo en condiciones de oscuridad por algunos días antes de transferir los individuos a un fotoperiodo de 16 horas luz favoreció el desarrollo *in vitro* de *Paphiopedilum wardii* (Zeng et al., 2012) y la obtención de un mayor porcentaje de individuos germinados y de protocormos con la primer hoja de *Habenaria macroceratitis* (Stewart & Kane, 2006); sin embargo, las condiciones continuas de oscuridad también podrían generar la formación de callo como ocurrió en el cultivo de *Chloraea crispa* (Quiroz et al., 2017), pero estas diferentes condiciones podrían ser probadas como alternativas para el cultivo de *S. macrantha*, esperando elevar el porcentaje de germinación e Índice de Desarrollo, así como obtener un elevado porcentaje final de plántulas y reducir el porcentaje de clorosis, e incluso la generación de tejido indiferenciado con potencial para micropropagar a esta especie.

CONCLUSIONES

La germinación asimbiótica *in vitro* de *Sobralia macrantha* fue inducida en todos los tratamientos establecidos, mostrándose el medio KC al 50% de su concentración de sales basales como el óptimo para el cultivo de esta especie y adicionado con papilla de frutos mixtos para inducir la germinación o jarabe de maíz para promover el desarrollo, observando desde el estadio de semilla hasta la formación de plántulas en un periodo de 90 días.

En ambos medios se obtuvieron plántulas sanas al final del cultivo; sin embargo, el medio KC, en comparación al medio MS, muestra ser promotor de la germinación e inductor del desarrollo obteniendo un valor de Índice de Desarrollo superior mientras que el porcentaje de clorosis es menor, por lo que *S. macrantha* responde de mejor manera a un medio de fórmula sencilla.

La concentración de sales basales más favorable, tanto para la germinación como para el desarrollo, de *S. macrantha* es 50%, ya que permite mantener un potencial osmótico favorable para la absorción de agua y nutrientes requeridos para iniciar y culminar el proceso de germinación, evitando el estrés hídrico que ocasiona la clorosis y consecuente pérdida de material vegetal.

El complejo natural que demostró ser significativamente importantes para el cultivo *in vitro* de *S. macrantha* fue la papilla de frutos mixtos que promovió la germinación en los primeros 18 días de cultivo; sin embargo, la adición de complejos al medio de cultivo puede alterar el potencial osmótico llegando a ocasionar el incremento de individuos cloróticos.

Se evidencia al jarabe de maíz como un sustituto de la sacarosa en su función de fuente de energía en el cultivo de *S. macrantha* para el desarrollo de los individuos después del rompimiento de la testa puesto que permite alcanzar un valor mayor de Índice de Desarrollo y aumenta el porcentaje final de plántulas obtenidas, pero en cuanto al porcentaje de germinación obtenido ambos azúcares son similares.

Se establece el protocolo para realizar la siembra de semillas de *S. macrantha* en medio KC al 50% de sus sales inorgánicas y adicionado con papilla de frutos mixtos como aditivo para promover la germinación, realizando el subcultivo de los protocormos en medio KC al

50% de sus sales basales con jarabe de maíz como fuente de carbono para su desarrollo hasta la obtención de plántulas para así evitar en lo posible la clorosis del tejido.

El esquema de la ontogenia de *S. macrantha* anteriormente presentado permite identificar los estadios considerados en este estudio, pero también los estados transitorios que se presentan, brindando información morfológica para estudios posteriores.

Como sugerencias para próximos estudios se encuentra la evaluación de diferentes fotoperiodos para inducir la germinación, así como probar otros complejos orgánicos, en combinación o de forma individual, tanto para promover la germinación como el desarrollo de *S. macrantha*, finalmente, también realizar ensayos con fuentes de carbono distintas a la sacarosa.

REFERENCIAS

- Abdelnour-Esquivel, A., & Escalant, J. V. (1994). *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales*. CATIE.
- Arditti, J. (1967). Factors Affecting the Germination of Orchid Seeds. *The Botanical Review*, 33(1), 1–97.
- Arditti, J. (1992). *Fundamentals of Orchid Biology*. Estados Unidos de América: John Wiley & Sons.
- Arditti, J. (2008). *Micropropagation of Orchids* (2a ed.). Blackwell Publishing.
- Benzing, D. H., Ott, D. W., & Friedman, W. E. (1982). Roots of *Sobralia macrantha* (Orchidaceae): structure and function of the velamen-exodermis complex. *American Journal of Botany*, 69(4), 608–6014.
- Boeri, P. (2015). Nutrientes para las plantas de probeta. En S. Sharry, M. Adema, & W. Abedini (Eds.), *Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro* (pp. 46–72). Editorial de la Universidad de La Plata.
- Calva, G., & Pérez, J. (2005). Cultivo de Células y Tejidos Vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*, 6 (11). Obtenido de http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/nov_art104a.pdf
- Chase, M. W., Cameron, K. M., Freudenstein, J. V., Pridgeon, A. M., Salazar, G., van den Berg, C., & Schuiteman, A. (2015). An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 177(2), 151–174. <https://doi.org/10.1111/boj.12234>
- CITES. (2019). Apéndices I, II y III de la CITES. Obtenido en Enero 28, 2020, de <https://www.cites.org/esp/app/appendices.php>
- Cox, L. D. (2013). Orquídeas: Importancia y uso en México. *Bioagrociencias*, 6(2), 4–7.
- Cruz, F. (2012). *Cultivo de tejidos vegetales (Manual de prácticas)*. Universidad Nacional Autónoma de México. FESC.
- Curtis, W., Hooker, J. D., Prain, D., Stapf, O., Bentham-Moxon Trust., Royal Botanic Gardens, K., ... Stanley Smith Horticultural Trust. (1849). *Sobralia macrantha* Lindl.

Curtis's Botanical Magazine, 45, Tab. 4446.

- De La Rosa, E., Andrade, J. L., & Torres, J. A. (2018). Las orquídeas epífitas: ¿cómo viven y sobreviven sobre los árboles? *BioDIVERSITAS*, (138), 1–6.
- Dutra, D., Johnson, T. R., Kauth, P. J., Stewart, S. L., Kane, M. E., & Richardson, L. (2008). Asymbiotic seed germination, in vitro seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 94, 11–21.
- Espejo, A. (2012). El endemismo en las Liliopsida mexicana. *Acta Botánica Mexicana*, (100), 195–257.
- Espejo, A., García, J., López, A. R., Jiménez, R., & Sánchez, L. (2002). *Orquídeas del estado de Morelos*. Herbario AMO.
- Fracchia, S., Silvani, V., Flachslan, E., Terada, G., & Sede, S. (2014). Symbiotic seed germination and protocorm development of *Aa achalensis* Schltr., a terrestrial orchid endemic from Argentina. *Mycorrhiza*, 24(1), 35–43.
- Freuler, M. J. (2008). *Orquídeas*. Argentina: Albatros.
- George, E. F., & Davies, W. (2008). Effects of the Physical Environment. En E. F. George, M. Hall, & G.-J. de Klerk (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture* (3a ed., pp. 423–464). Springer.
- George, E. F., & De Klerk, G.-J. (2008). The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients. En Edwin. F. George, M. A. Hall, & G.-J. de Klerk (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture* (3a ed., pp. 65–113). Springer.
- Gil, Á. (2010). *Tratado de nutrición. Tomo II. Composición y calidad nutritiva de los alimentos* (2a ed.). Madrid: Médica Panamericana.
- González-Aguilar, M. A., & Burelo-Ramos, C. M. (2017). Adiciones a la orquideoflora de Tabasco, México. *Acta Botánica Mexicana*, (121), 161–167.
- González-Márquez, B., González-Caballero, O., Pérez y Sosa, M. C., González-Olvera, P., & Chávez-Ávila, V. M. (2013). Cultivo in vitro de *Sobralia macrantha* y *Stanhopea*

- tigrina. *Memorias Segundo Encuentro Mexicano de Orquideología*, 33.
- Hammel, B. E., Grayum, M. H., Herrera, C., & Zamora, N. (Eds.). (2003). *Manual de Plantas de Costa Rica. Volumen III*. Missouri, E.U.A.: Missouri Botanical Garden Press.
- Harrison, C. R., & Arditti, J. (1978). Physiological changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). *Botanical Gazette*, 139(2), 180–189.
- Jáuregui, J., & Chávez, N. A. (2006). *Glosario de Biotecnología*. México: Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Martínez-Villegas, Y. M., Andrade-Rodríguez, M., Colinas-León, M. T., Villegas-Torres, Ó. G., Castillo-Gutiérrez, A., & Alia-Tejacal, I. (2015). Efecto de las sales inorgánicas del medio de cultivo en el crecimiento de Pascuita (*Euphorbia leucocephala* Lotsy). *Revista Fitotecnica Mexicana*, 38(4), 369–374.
- Mayo, A., Cázares, J. G., De la Cruz, E., & Flores, A. (2010). *Germinación in vitro de Semillas y Desarrollo de Plántulas de Orquídeas Silvestres de Tabasco*. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
- McKendrick, S. (2000). *Manual para la germinación in vitro de orquídeas*. Obtenido de https://blog.solusan.com/wp-content/uploads/2007/05/germinacion_orquideas.pdf
- Meisel, J. E., Kaufmann, R. S., & Pupulin, F. (2014). *Orchids of Tropical America: an introduction and guide*. E.U.A.: Cornell University Press.
- Menchaca G, R. A., Ramos P, J. M., Moreno M, D., Luna R, M., Mata R, M., Vázquez G, L. M., & Lozano R, M. A. (2011). Germinación in vitro de híbridos de *Vanilla planifolia* y *V. pompona*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(1), 80–84.
- Menchaca, R. (2011). Manual para la propagación de orquídeas. *Comision Nacional Forestal*, 1(Micropropagación de orquídeas), 30–38. Obtenido de http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/documentos/MANUAL_PARA_LA_PROPAGACION_DE_ORQUIDEAS.PDF
- Menchaca, R. A., & Moreno, D. (2011). *Conservación de orquídeas, una tarea de todos*. Universidad Autónoma de Chapingo.

- Merino, M. E. (1987). Medio de cultivo. En D. Hurtado & M. E. Merino (Eds.), *Cultivo de tejidos vegetales* (pp. 67–85). Trillas.
- Missouri Botanical Garden. (s.f.). Tropicos. Obtenido en Agosto 16, 2018, de <http://www.tropicos.org/Name/50246311>
- Morales-Rubio, M. E., Espinosa-Leal, C., & Garza-Padrón, R. A. (2016). Cultivo de tejidos vegetales y su aplicación en productos naturales. En C. Rivas-Morales, M. A. Oranday-Cárdenas, & M. J. Verde-Star (Eds.), *Investgación en plantas de importancia médica* (pp. 351–410). OmniaScience.
- Morren, C. (1847). *Sobralia macrantha* Lindl. *Annales de La Société Royale d'agriculture et de Botanique de Gand: Journal d'horticulture et Des Sciences Accessoires*, 3, 128–130.
- Musharof, M., Kant, R., Thanh, P., Winarto, B., Zeng, S., & Teixeira, J. A. (2013). The Application of Biotechnology to Orchids. *Critical Reviews in Plant Sciencces*, 32(2), 69–139.
- Nadarajan, J., Wood, S., Marks, T. S., 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.
- Nava, J. J., Jiménez-Aparicio, A. R., De Jesús-Sánchez, A., Arenas-Ocampo, M. L., Ventura-Zapata, E., & Evangelista-Lozano, S. (2011). Estudio de la morfología y aclimatación de *Laelia eyermaniana* Rchb.f. generadas in vitro. *Polibotánica*, (32), 107–117.
- Ortho Books. (2005). *Complete Guide to Orchids: Selecting, Growing, Displaying*. Ortho Books.
- Padrón, S. (2006). *Germinación asimbiótica in vitro de Govenia capitata (Orchidaceae)*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Pardo, J. A. (2008). *Desarrollo de un medio de cultivo universal para la propagación de orquídeas en el laboratorio*. Universidad de las Américas.
- Park, J., & Yeung, E. C. (2018). Orchid Seed Germination and Micropropagation II: Media Information and Composition. In E. C. Yeung & Y.-I. Lee (Eds.), *Orchid Propagation:*

- From Laboratories to Greenhouses-Methods and Protocols* (pp. 127–150). Nueva York: Humana Press.
- Pedroza-Manrique, J., & Mican-Gutiérrez, Y. (2006). Asymbiotic germination of *Odontoglossum gloriosum* Rchb.f. (Orchidaceae) under in vitro conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42, 543–547.
- Pérez, F., & Pita, J. M. (s.f.). Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. *Hojas Divulgadoras. Universidad Politécnica de Madrid*, (2112).
- Phyto Technology Laboratories. (2007). Murashige & Skoog Basal Salt Mixture. Obtenido en Abril 27, 2019, de <https://phytotechlab.com/mwdownloads/download/link/id/250/>
- Pierik, R. L. M. (1990). *Cultivo in vitro de plantas superiores*. España: Ediciones Mundi-Prensa.
- Portillo, L., & Santacruz-Ruvalcaba, F. (2004). Totipotencia celular: Una revisión y aplicación del concepto. *Scientia CUCBA*, 6(1–2), 13–18.
- Preece, J. (2008). Stock Plant Physiological Factors Affecting Growth and Morphogenesis. En E. F. George, M. Hall, & G.-J. de Klerk (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture* (3a ed., pp. 403–422). Springer.
- Quiroz, K., Saavedra, J., Vogel, H., Verdugo, G., Caligari, P. D. S., & García-González, R. (2017). In vitro asymbiotic germination for micropropagation of the recalcitrant terrestrial orchid *Chloraea crispa* (Orchidaceae). *Applications in Plant Sciences*, 5(8), 1–9.
- Rangel, M. (2006). *Germinación simbiótica y reintroducción de orquídeas terrestres en la reserva ecológica del Pedregal de San Ángel, México, D.F.* Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rittershausen, B., & Rittershausen, W. (2010). *Orquídeas: todos los consejos sobre las orquídeas y su cultivo*. LIBSA.
- Roca, W. M., & Mroginski, L. A. (1991). Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. En W. M. Roca & L. A. Mroginski (Eds.), *Cultivo de Tejidos en la*

- Agricultura: fundamentos y aplicaciones* (pp. 1–18). Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Rodríguez, L. M. (2000). *Germinación y desarrollo in vitro de Paphiopedilum exstaminodium* (Castaño, Hágsater & Aguirre) V. A. Albert & Börge Pett. y *Paphiopedilum caudatum* (Rolfe) V. A. Albert & Börge Pett. (Orchidaceae), especies en peligro de extinción. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rodríguez, W. (2015). Orquídeas Mexicanas. *Sobralia macrantha*. Obtenido en Septiembre 19, 2019, de [http://amo.com.mx/galerias/Mexicanas/slides/Sobralia macrantha.html](http://amo.com.mx/galerias/Mexicanas/slides/Sobralia%20macrantha.html)
- Rojas, S., García, J., & Alarcón, M. (2004). *Propagación asexual de plantas. Conceptos Básicos y Experiencias con Especies Amazónicas*. Colombia: PRODUMEDIOS.
- Royal Botanic Gardens. (s.f.). World Checklist of Selected Plant Families (WCSP). Obtenido en Agosto 16, 2018, de https://wmsp.science.kew.org/namedetail.do?name_id=247364
- Ruiz, M. de los Á. (2009). *El análisis de tetrazolio en el control de calidad de semillas. Caso de estudio: Cebadilla chaqueña* (Vol. 77). Argentina: INTA.
- Salazar-Mercado, S. A., & Orlando-Cancino, G. (2012). Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación in vitro de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 53–59.
- Seaton, P., & Ramsay, M. (2005). *Growing orchids from seeds*. Londres: Royal Botanical Garden.
- SEMARNAT. (2011). *Biodiversidad Conocer para conservar*. México.
- SEMARNAT. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo (2019). México: Diario Oficial de la Federación.
- Sigma-Aldrich. (2019). Orchid Culture Media Formulations. Obtenido en Abril 7, 2019, de <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/orchid-culture-media.html>

- Sosa, V., De Nova, J. A., & Vásquez-Cruz, M. (2018). Evolutionary history of the flora of Mexico: Dry forests cradles and museums of endemism. *Journal of Systematics and Evolution*, 56(5), 523–536.
- Stewart, S., & Kane, M. (2007). Symbiotic seed germination and evidence for in vitro micobiont specificity in *Spiranthes brevilabris* (Orchidaceae) and its implications for species-level conservation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43, 178–186.
- Stewart, S. L., & Kane, M. E. (2006). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 86, 147–158.
- Suzuki, R. M., Moreira, V. C., Pescador, R., & De Melo, W. (2012). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of the threatened orchid *Hoffmannseggella cinnabarina*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 48(5), 500–511.
- Tejeda-Sartorius, O., & Téllez-Velasco, M. de los Á. A. (2017). Riqueza de la familia Orchidaceae en un bosque mesófilo de montaña en Chocamán, Veracruz, México. *Acta Botánica Mexicana*, (121), 139–149.
- Thorpe, T., Stasolla, C., Yeung, E. C., de Klerk, G.-J., Roberts, A., & George, E. F. (2008). The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems. En Edwin F George, M. A. Hall, & G.-J. de Klerk (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture* (3a ed., pp. 115–173). Springer.
- Velasco, L., & Beltrán, P. (2008). *Orquídeas del Parque Natural Sierra de Grazalema*. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía.
- Velázquez Barrón, M. de los Á., & Fuentes Dávila, G. (2009). Germinación de la semilla de cuatro variedades de trigo (*Triticum* spp. L.). in vitro. *BIOtecnica*, 11(3), 12–24.
- Vidal, O., Vásquez, M., & Bauk, V. (2012). Orquídeas, la efímera belleza de Torres del Paine. Proyecto “Las orquídeas del Parque Nacional Torres del Paine: monitoreo y ecoturismo para la conservación de la biodiversidad.” *Revista Chagual*, (10), 32–34.

- Villareal, B. (2015). ¿Cómo se forman las nuevas plantas in vitro? En S. Sharry, M. Adema, & W. Abedini (Eds.), *Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro* (pp. 92–101). Editorial de la Universidad de La Plata.
- Villaseñor, J. L. (2004). Los géneros de plantas vasculares de la flora de México. *Boletín de La Sociedad Botánica de México*, (75), 105–135.
- Yam, T. W., & Arditti, J. (2018). Orchid Micropropagation: An Overview of Approaches and Methodologies. En E. C. Yeung & Y.-I. Lee (Eds.), *Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses-Methods and Protocols* (pp. 151–178). Nueva York: Humana Press.
- Yeung, E. C., Li, Y.-Y., & Lee, Y.-I. (2018). Understanding Seed and Protocorm Development in Orchids. En Y.-I. Lee & E. C.-T. Yeung (Eds.), *Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses-Methods and Protocols* (pp. 3–26). Nueva York: Humana Press.
- Zeng, S., Wu, K., Teixeira da Silva, J. A., Zhang, J., Chen, Z., Xia, N., & Duan, J. (2012). Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid. *Scientia Horticulturae*, 138, 198–209.
- Ziv, M., & Chen, J. (2008). The Anatomy and Morphology of Tissue Cultured Plants. En E. F. George, M. Hall, & G.-J. de Klerk (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture* (3a ed., pp. 465–477). Springer.
- Zotz, G. (2013). The systematic distribution of vascular epiphytes - a critical update. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 171, 453–481.

ANEXOS

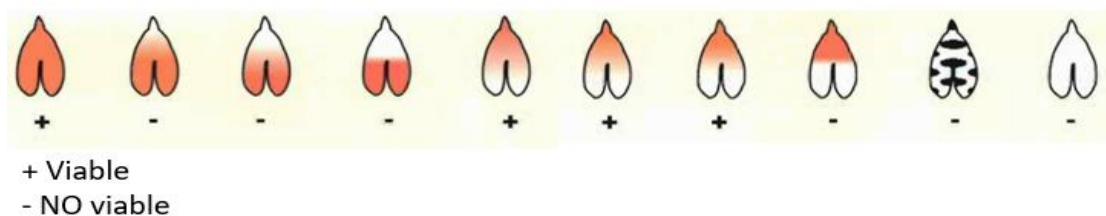
Anexo 1: Prueba Topográfica por Tetrazolio.

La viabilidad de un lote de semillas, no latentes, hace referencia a su capacidad de germinar y originar plántulas normales en condiciones ambientales favorables, para su evaluación y cuantificación se han utilizado diferentes pruebas, entre los que destacan: ensayos de germinación, prueba o ensayo de tetrazolio y radiografía con rayos X (Pérez & Pita, s.f.).

Particularmente la prueba de tetrazolio es utilizado para conocer la viabilidad de semillas que presentan latencia o con una velocidad de germinación muy baja (Pérez & Pita, s.f.).

El ensayo de tetrazolio es una prueba bioquímica, se basa en que una vez hidratados los tejidos de la semilla se activan rutas metabólicas, en las que muchas reacciones son de oxidación, liberando electrones que son capaces de reducir otras sustancias químicas, este hecho es utilizado para estimar el grado de actividad de los tejidos embrionarios y por tanto su viabilidad. Más específicamente, al ser hidratada la semilla las deshidrogenasas inician su actividad, liberando iones hidrógeno, ocasionando la reducción del tetrazolio (2,3,5-trifeniltetrazolio o cloruro de tetrazolio) que es incoloro, a formazán, lo que da una coloración rojo-naranja, por lo tanto, las células teñidas son aquellas que realizan respiración y por tanto están vivas. La viabilidad se determina en función del patrón de tinción del embrión y la intensidad de la coloración (Pérez & Pita, s.f.; Ruiz, 2009).

Algunas veces, los embriones no son teñidos completamente, indicando áreas de tejido muerto debido al deterioro de la semilla, para la evaluación de la viabilidad de estos embriones es importante considerar no solamente la intensidad del color, sino también el tamaño y posición de las áreas necróticas (Pérez & Pita, s.f.) como se muestra a continuación:



Como ventajas, es un método rápido, adecuado para evaluar la capacidad germinativa potencial y se puede detectar deterioro germinativo. Sin embargo, también tiene desventajas en cuanto a la interpretación visual de la tinción ya que es subjetiva y requiere experiencia y puede no detectar daño menores como infección fúngica o daños por pesticidas (Ruiz, 2009).

Anexo 2: Formulaciones de medio.

Existen diferentes fórmulas para la preparación de medio, en el presente estudio solamente se utilizaron dos, de las cuales se presenta a continuación los componentes de sales basales y concentración de cada uno de ellos de acuerdo a lo reportado por Phyto Technology Laboratories (2007) y Sigma-Aldrich (2019).

Componente [mg/L]	Formula química	Knudson C	Murashige & Skoog
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	0.056	6.2
Ácido molíbdico (sal sódica) dihidratada	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	-	0.25
Cloruro de calcio anhidro	CaCl ₂	-	332.2
Cloruro de cobalto hexahidratado	CoCl ₂ ·6H ₂ O	-	0.025
Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄	250.0	170.0
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	-	1650.0
Nitrato de calcio	Ca(NO ₃)	694.4	-
Nitrato de potasio	KNO ₃	-	1900.0
Sal disódica dihidratada	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	-	37.26
Sulfato cúprico pentahidratado	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0624	0.025
Sulfato de amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄	500.0	-
Sulfato de magnesio anhidro	MgSO ₄	122.125	180.7
Sulfato de manganeso hidratado	MnSO ₄ ·H ₂ O	5.682	16.9
Sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.331	8.6
Sulfato ferroso heptahidratado	FeSO ₄ ·7H ₂ O	25.0	27.8
Trióxido de molibdeno	MoO ₃	0.016	-
Yoduro de potasio	KI	-	0.83

Para estos dos medios nutritivos también se ha comparado el contenido total de cada una de los componentes minerales o elementos presentes en la fórmula (Park & Yeung, 2018) como se muestra a continuación:

Sal mineral	KC	MS
Macronutrientes [mM]		
Amonio	7.57	20.61
Calcio	4.23	3.0
Cloro	-	6.0
Magnesio	1.01	1.5
Nitrato	8.47	39.4
Potasio	1.84	20.0
Fosfato	1.84	1.25
Sulfato	4.92	1.73
Sodio	-	0.2
Micronutrientes (μM)		
Boro	-	100
Cobalto	-	0.1
Cobre	-	0.1
Hierro	89.9	100
Yodo	-	5
Manganeso	33.6	100
Molibdeno	-	1.0
Níquel	-	-
Aluminio	-	-
Zinc	-	36.0
<i>Total de Nitrógeno [mM]</i>	16.0	60.0

Anexo 3: Composición de los complejos naturales.

Los complejos naturales utilizados fueron papilla de frutos mixtos y papilla de frutos tropicales de la marca Gerber®, así como agua de coco Calahua® y como azúcar experimental jarabe de maíz Karo®, de los cuales se muestran sus ingredientes a continuación:

Componente	Jarabe de maíz	Papilla frutos mixtos	Papilla frutos tropicales	Agua de coco
Ácido cítrico	✓	✓	✓	-
Ácido fólico	-	✓	✓	-
Agua	✓	-	-	-
Agua de coco natural	-	-	-	✓
Almidón de tapioca modificado	-	✓	✓	-
Glucosa de maíz	✓	-	-	-
Harina de arroz	-	✓	✓	-
Hierro	-	✓	✓	-
Jarabe de maíz de alta fructuosa	✓	-	-	-
Jugo de naranja	-	-	✓ (6.3%)	-
Jugo de piña	-	✓ (8.9%)	-	-
Puré de guayaba	-	-	✓ (21.2%)	-
Puré de mango	-	✓ (40%)	✓ (37.9%)	-
Puré de manzana	-	✓ (39.1%)	-	-
Puré de papaya	-	-	✓ (24.7%)	-
Puré de plátano	-	✓ (8%)	✓ (7.1%)	-
Saborizante natural	✓	-	-	-
Sal yodada	✓	-	-	-
Vitamina B1	✓	-	-	-
Vitamina C	-	✓	✓	-

Anexo 4: Análisis de varianza para el porcentaje de clorosis por todos los tratamientos.

<i>Efectos principales</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:TIEMPO (días)	8784.77	1	8784.77	186.85	0.0000
B:MEDIO	8224.52	1	8224.52	174.93	0.0000
C:[] SALES	11548.3	2	5774.16	122.81	0.0000
D:COMPLEJO	5832.8	4	1458.2	31.02	0.0000
INTERACCIONES					
AB	59.9238	1	59.9238	1.27	0.2600
AC	2572.47	2	1286.24	27.36	0.0000
AD	247.367	4	61.8418	1.32	0.2646
BC	2681.09	2	1340.54	28.51	0.0000
BD	556.36	4	139.09	2.96	0.0205
CD	862.928	8	107.866	2.29	0.0217
RESIDUOS	12177.1	259	47.016		
TOTAL (CORREGIDO)	53419.5	288			

Anexo 4.1: Prueba de Rangos Múltiples para porcentaje de clorosis por tiempo.

<i>TIEMPO (días)</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
195	144	21.0656	0.572541	X
90	145	32.1036	0.570509	X

Anexo 4.2: Prueba de Rangos Múltiples para porcentaje de clorosis por medio nutritivo.

<i>MEDIO</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
KC	147	21.2387	0.566349	X
MS	142	31.9305	0.577271	X

Anexo 4.3: Prueba de Rangos Múltiples para porcentaje de clorosis por concentración de sales basales.

<i>[] SALES</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
50	96	18.3371	0.701828	X
75	95	27.7317	0.70633	X
100	98	33.685	0.693684	X

Anexo 4.4: Pruebas de Rangos Múltiples para porcentaje de clorosis por complejo orgánico.

<i>COMPLEJO</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
mk	60	18.05	0.885211	X
gft	58	26.7293	0.902343	X
sac	55	28.4146	0.927119	X
gfm	60	29.1333	0.885211	X
ac	56	30.5958	0.921357	X

Anexo 5: Análisis de varianza para el porcentaje de germinación por todos los tratamientos.

<i>Efectos principales</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:TIEMPO	701258.	8	87657.3	995.60	0.0000
B:MEDIO	18446.2	1	18446.2	209.51	0.0000
C:[] SALES	12377.4	2	6188.72	70.29	0.0000
D:COMPLEJO	11770.5	4	2942.62	33.42	0.0000
INTERACCIONES					
AB	2389.26	8	298.657	3.39	0.0007
AC	1742.22	16	108.888	1.24	0.2323
AD	1879.59	32	58.7371	0.67	0.9218
BC	8095.04	2	4047.52	45.97	0.0000
BD	6966.69	4	1741.67	19.78	0.0000
CD	5506.11	8	688.263	7.82	0.0000
ABC	1204.0	16	75.2501	0.85	0.6228
ABD	1132.12	32	35.3788	0.40	0.9989
ACD	986.272	64	15.4105	0.18	1.0000
BCD	6037.47	8	754.684	8.57	0.0000
RESIDUOS	97465.6	1107	88.0448		
TOTAL (CORREGIDO)	880011.	1312			

Anexo 5.1: Prueba de Rangos Múltiples para porcentaje de germinación por tiempo.

<i>TIEMPO</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
6	148	-0.0016897	0.772313	X
18	148	72.1338	0.772313	X
25	147	72.8867	0.775384	X
39	145	73.3317	0.781627	X
32	145	73.3317	0.781627	X
56	145	73.3911	0.781627	X
90	145	73.3922	0.781627	X
46	145	73.3931	0.781627	X
81	145	73.5289	0.781627	X

Anexo 5.2: Prueba de Rangos Múltiples para porcentaje de germinación por medio nutritivo.

<i>MEDIO</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
MS	645	61.2848	0.370964	X
KC	668	68.8013	0.36346	X

Anexo 5.3: Prueba de Rangos Múltiples para porcentaje de germinación por concentración de sales basales.

<i>[] SALES</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
100	441	60.7111	0.447824	X
50	435	66.9226	0.451372	X
75	437	67.4955	0.450212	X

Anexo 5.4: Prueba de Rangos Múltiples para porcentaje de germinación por complejo orgánico.

<i>COMPLEJO</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
ac	257	61.4555	0.587907	X
gft	264	61.7969	0.578752	X
mk	270	66.037	0.571045	X
sac	252	66.6667	0.594362	X
gfm	270	69.2593	0.571045	X

Anexo 6: Análisis de varianza para el Índice de Desarrollo por todos los tratamientos.

<i>Efectos principales</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:TIEMPO (días)	8.98138E6	9	997931.	1024.72	0.0000
B:MEDIO	262183.	1	262183.	269.22	0.0000
C:[] SALES	419066.	2	209533.	215.16	0.0000
D:COMPLEJO	276100.	4	69025.1	70.88	0.0000
INTERACCIONES					
AB	162178.	9	18019.8	18.50	0.0000
AC	87396.6	18	4855.37	4.99	0.0000
AD	46323.6	36	1286.77	1.32	0.0979
BC	70056.2	2	35028.1	35.97	0.0000
BD	98961.0	4	24740.2	25.40	0.0000
CD	76457.3	8	9557.17	9.81	0.0000
RESIDUOS	1.32737E6	1363	973.861		
TOTAL (CORREGIDO)	1.18803E7	1456			

Anexo 6.1: Prueba de Rangos Múltiples para I.D. por tiempo.

<i>TIEMPO (días)</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
6	148	100.284	2.56675	X
18	148	219.756	2.56675	X
25	147	246.282	2.57531	X
32	145	263.372	2.5941	X
39	145	271.039	2.5941	XX
46	145	277.68	2.5941	XX
56	145	287.331	2.5941	X
81	145	342.65	2.5941	X
90	145	351.565	2.5941	X
195	144	402.699	2.60384	X

Anexo 6.2: Prueba de Rangos Múltiples para I.D. por medio nutritivo.

<i>MEDIO</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
MS	716	262.83	1.16944	X
KC	741	289.701	1.14731	X

Anexo 6.3: Prueba de Rangos Múltiples para I.D. por concentración de sales basales.

<i>[] SALES</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
100	490	253.127	1.41189	X
75	484	282.386	1.42213	X
50	483	293.284	1.42314	X

Anexo 6.4: Prueba de Rangos Múltiples para I.D. por complejo orgánico.

<i>COMPLEJO</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
ac	285	256.498	1.85527	X
gft	293	264.893	1.82543	X
sac	279	281.884	1.87568	X
gfm	300	283.063	1.80172	X
mk	300	294.99	1.80172	X

Anexo 7: Análisis de varianza para el porcentaje de plántulas por todos los tratamientos.

<i>Efectos principales</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:TIEMPO (días)	100781.	1	100781.	1329.98	0.0000
B:MEDIO	74.329	1	74.329	0.98	0.3229
C:[] SALES	7251.84	2	3625.92	47.85	0.0000
D:COMPLEJO	4660.33	4	1165.08	15.38	0.0000
INTERACCIONES					
AB	22445.1	1	22445.1	296.20	0.0000
AC	650.854	2	325.427	4.29	0.0146
AD	866.401	4	216.6	2.86	0.0241
BC	940.749	2	470.375	6.21	0.0023
BD	1702.91	4	425.727	5.62	0.0002
CD	1008.99	8	126.124	1.66	0.1073
RESIDUOS	19626.1	259	75.7765		
TOTAL (CORREGIDO)	161978.	288			

Anexo 7.1: Prueba de Rangos Múltiples para porcentaje de plántulas por tiempo.

<i>TIEMPO (días)</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
90	145	12.9982	0.72428	X
195	144	50.3847	0.72686	X

Anexo 7.2: Prueba de Rangos Múltiples para porcentaje de plántulas por medio nutritivo.

<i>MEDIO</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
KC	147	31.1833	0.718999	X
MS	142	32.1997	0.732865	X

Anexo 7.3: Prueba de Rangos Múltiples para porcentaje de plántulas por concentración de sales basales.

<i>[] SALES</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
100	98	25.6428	0.880655	X
75	95	31.5383	0.89671	X
50	96	37.8934	0.890995	X

Anexo 7.4: Prueba de Rangos Múltiples para porcentaje de plántulas por complejo orgánico.

<i>COMPLEJO</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
ac	56	25.5667	1.16969	X
gft	58	29.537	1.14556	XX
sac	55	32.7037	1.17701	X
gfm	60	32.95	1.12381	XX
mk	60	37.7	1.12381	X