



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
Departamento de Química

**TESIS**

**Propagación *in vitro* de *Laelia speciosa* (Orchidaceae) nativa de  
Aguascalientes**

**PRESENTA**

Luz de Aurora González Castellanos

Para obtener el grado de Maestra en Ciencias en el Área de Biotecnología  
Vegetal

**TUTOR**

Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch

**COMITÉ TUTORAL**

Dr. Francisco Morales Domínguez

M. en C. Laura Ma. De Lourdes  
de la Rosa Carrillo

Aguascalientes, Ags., 21 de Noviembre 2014



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES  
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

**MC. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS**  
**DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**  
**P R E S E N T E**

Por medio del presente como tutor designado de la estudiante **LUZ DE AURORA GONZÁLEZ CASTELLANOS**, con ID 18789, quien realizó la tesis titulada: **PROPAGACIÓN IN VITRO DE *Laelia speciosa* (ORCHIDACEAE) NATIVA DE AGUASCALIENTES**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**

**"Se Lumen Proferre"**

Aguascalientes, Ags., a 19 de noviembre de 2014.

**Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch**  
**Tutor de tesis**

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado  
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química  
c.c.p.- Consejero Académico  
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES  
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

**MC. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS**  
**DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**  
**P R E S E N T E**

Por medio del presente como tutor designado de la estudiante **LUZ DE AURORA GONZÁLEZ CASTELLANOS**, con ID 18789, quien realizó la tesis titulada: **PROPAGACIÓN IN VITRO DE *Laelia speciosa* (ORCHIDACEAE) NATIVA DE AGUASCALIENTES**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**  
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 20 de noviembre de 2014.

**M.C. Laura María de Lourdes de la Rosa Carrillo**  
**Tutor de tesis**

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado  
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química  
c.c.p.- Consejero Académico  
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
Departamento de Química



ANIVERSARIO  
UAA

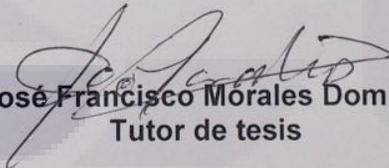
MC. JOSÉ DE JESUS RUIZ GALLEGOS  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
P R E S E N T E

Por medio de la presente como tutor designado de la estudiante **LUZ DE AURORA GONZÁLEZ CASTELLANOS**, con ID 18789, quien realizó la tesis titulada: **PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *Laelia speciosa* (ORCHIDACEAE) NATIVA DE AGUASCALIENTES**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 21 de noviembre de 2014.

  
Dr. José Francisco Morales Domínguez  
Tutor de tesis

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaria de Investigación y Posgrado  
c.c.p.- Jefatura del Dpto. de Química  
c.c.p.- Consejero Académico  
c.c.p.- Minuta del Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

**MÉDICO CIRUJANO LUZ DE AURORA GONZÁLEZ CASTELLANOS  
ALUMNO (A) DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN EL  
ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL.  
P R E S E N T E.**

Estimado (a) alumno (a) González:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"PROPAGACION IN VITRO DE *Laelia speciosa* (ORCHIDACEAE) NATIVA DE AGUASCALIENTES"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE  
Aguascalientes, Ags., 21 de noviembre de 2014  
"SE LUMEN PROFERRE"  
EL DECANO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS



c.c.p.- Interesada  
JJRG,mjda

## AGRADECIMEINTOS

A mi familia por siempre y por todo.

Al Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch, por todas las facilidades otorgadas, el apoyo y sus invaluable enseñanzas. Gracias por la libertad y al mismo tiempo por toda la ayuda.

A la M. en C. Laura María de Lourdes de la Rosa Carrillo, por su tiempo, atención y su ayuda en la realización de esta Tesis.

Al Dr. J. Francisco Morales Domínguez, por su apoyo, atención, correcciones y por su visión a futuro.

Gracias a Lupita, Alejandra, Isaac, Martita, Maestra y Leo por su infinita y constante ayuda. Mil gracias.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo y la beca para estudios de Maestría otorgada (475219).

## DEDICATORIA

A todo aquel que lea este documento y le sea de utilidad.

Eres la razón de su elaboración.



## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Índice de Tablas	3
Índice de Figuras	4
Acrónimos	6
Resumen	7
Abstract	8
Introducción	9
Importancia de las Orquídeas	9
La Orquídeas y su problemática	14
Estrategias de Conservación	16
Orquídeas en Aguascalientes	17
El género <i>Laelia</i>	19
La orquídea <i>Laelia speciosa</i>	20
Reconocimiento	21
Estado de Conservación	21
Cultivo de Tejidos Vegetales	22
Capítulos	26
Justificación	26
Hipótesis	26
Objetivos	26
General	26
Específicos	27
Metodología	27
Germinación de semillas de manera asimbiótica	27
Multiplicación <i>in vitro</i> de protocormos	28
Multiplicación <i>in vitro</i> de Estructuras Tipo Protocormo	28
Multiplicación <i>in vitro</i> a partir de yemas axilares	29
Crecimiento y desarrollo de plántulas obtenidas <i>in vitro</i>	30
Aclimatación	30

Resultados y Discusiones	32
Germinación de semillas de manera asimbiótica	32
Multiplicación <i>in vitro</i> de protocormos	35
Multiplicación <i>in vitro</i> de Estructuras Tipo Protocormo	37
Multiplicación <i>in vitro</i> a partir de yemas axilares	40
Crecimiento y desarrollo de plántulas obtenidas <i>in vitro</i>	56
Aclimatación	62
Conclusiones	65
Glosario	67
Bibliografía	69
Anexos	75



## ÍNDICE DE TABLAS

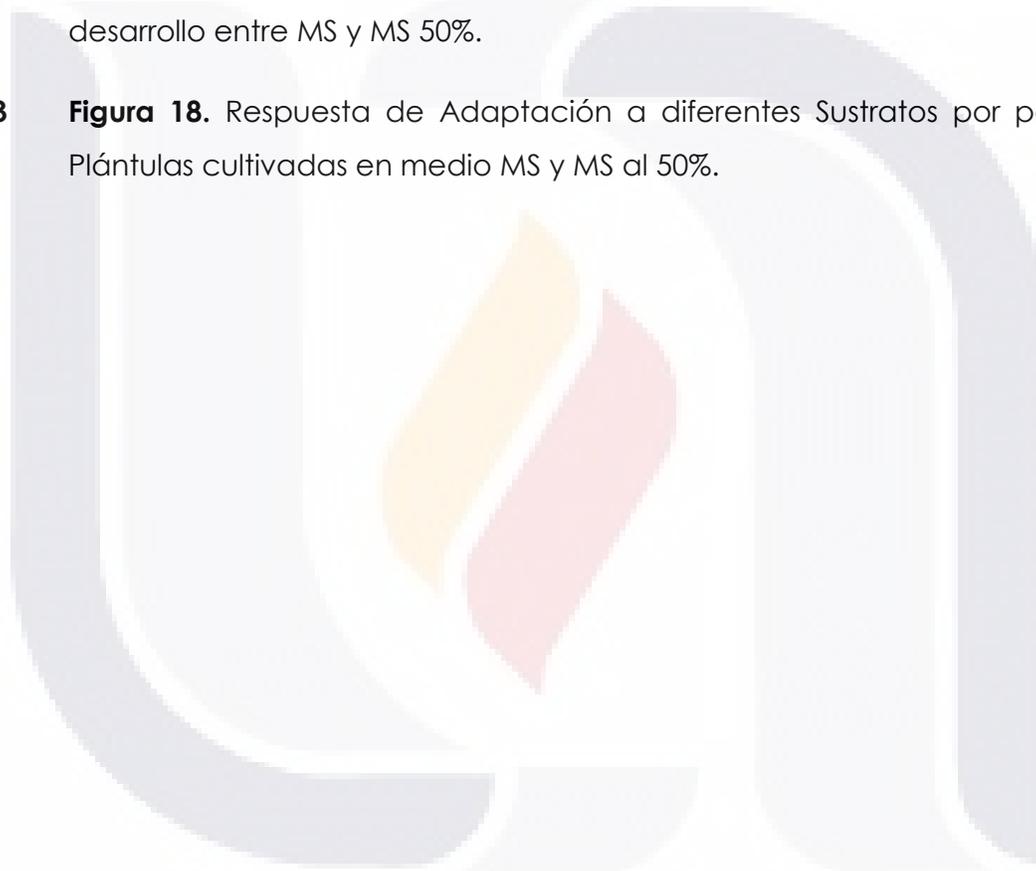
Pág.

- 41** **Tabla 1.** Datos obtenidos del Tratamiento con Benciladenina a diferentes concentraciones en el medio de cultivo para multiplicación por Yemas Axilares.
- 42** **Tabla 2.** Resultados de la prueba de ANOVA aplicada a los datos obtenidos ante los tratamientos con diferentes concentraciones de BA en el medio.
- 42** **Tabla 3.** Resultados del Test de Tukey aplicado a los datos obtenidos ante diferentes concentraciones de BA.
- 47** **Tabla 4.** Datos obtenidos del tratamiento con Isopentiladenina (2iP) a diferentes concentraciones en el medio de cultivo para multiplicación por Yemas Axilares.
- 47** **Tabla 5.** Resultados de la prueba de ANOVA aplicada a los datos obtenidos ante el tratamiento con diferentes concentraciones de 2iP en el medio.
- 48** **Tabla 6.** Resultados del Test de Tukey aplicado a los datos obtenidos ante diferentes concentraciones de 2iP.
- 51** **Tabla 7.** Datos obtenidos del experimento con Metatopolina (MT) a diferentes concentraciones en el medio de cultivo.
- 51** **Tabla 8.** Resultados de la prueba de ANOVA aplicada a los datos obtenidos ante el tratamiento con diferentes concentraciones de MT en el medio de cultivo.
- 52** **Tabla 9.** Resultados del Test de Tukey aplicado a los datos obtenidos ante diferentes concentraciones de MT.
- 60** **Tabla 10.** Crecimiento y Desarrollo. Contraste de datos obtenidos de los 2 medios de cultivo que generaron crecimiento (M S y MS al 50%).

## ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.	
12	<b>Figura 1.</b> Dos ilustraciones de Orquídeas.
18	<b>Figura 2.</b> Localización de <i>Laelia speciosa</i> en el estado de Aguascalientes.
19	<b>Figura 3.</b> Morfología de una <i>Laelia</i> .
20	<b>Figura 4.</b> <i>Laelia speciosa</i> .
34	<b>Figura 5.</b> Germinación Asimbiótica de Semillas de <i>L. speciosa</i> .
35	<b>Figura 6.</b> Multiplicación de Protocormos procedentes de semillas.
37	<b>Figura 7.</b> Multiplicación de PLB's (Protocorm Like Bodies).
40	<b>Figura 8.</b> Gráfica de los Brotes por explante (BPE) obtenidos ante diferentes concentraciones de Benciladenina (BA).
45	<b>Figura 9.</b> Comparación de respuesta de los explantes ante diferentes tratamientos de Benciladenina. Fotografías de la respuesta al tratamiento con diferentes concentraciones de BA en el medio.
46	<b>Figura 10.</b> Gráfico de los Brotes por explante (BPE) en tratamientos con Isopentiladenina (2iP).
49	<b>Figura 11.</b> Comparación de respuesta de los explantes ante diferentes tratamientos de Isopentiladenina. Fotografías de la respuesta al tratamiento con diferentes concentraciones de 2iP en el medio.
50	<b>Figura 12.</b> Gráfico de los Brotes por explante (BPE) obtenidos ante diferentes concentraciones de Metatopolina (MT).
53	<b>Figura 13.</b> Comparación de respuesta de los explantes ante diferentes tratamientos de Metatopolina (MT).

- 54** **Figura 14.** Gráfica comparativa de las mejores respuestas ante los tratamientos con Beciladenina, Isopentiladenina y Metatopolina.
- 57** **Figura 15.** Fotografías comparativas entre las respuestas de los explantes sometidos a diferentes medios de cultivo para Crecimiento y Desarrollo.
- 58** **Figura 16.** Explantes sometidos a Medio MS + Carbón Activado (CA).
- 61** **Figura 17.** Grafica Comparativa de Resultados para Crecimiento y desarrollo entre MS y MS 50%.
- 63** **Figura 18.** Respuesta de Adaptación a diferentes Sustratos por parte de Plántulas cultivadas en medio MS y MS al 50%.



## ACRÓNIMOS

<b>ANA</b>	Acido Naftalenacético
<b>BA</b>	N <sup>6</sup> -Benciladenina
<b>BPE</b>	Brotos Por Explante
<b>CA</b>	Carbón Activado
<b>GA</b>	Acido Giberélico
<b>MS</b>	Murashigue Skoog (Medio de Cultivo)
<b>MT</b>	Metatopolina/N <sup>6</sup> -(meta-hidroxibencil) adenina
<b>PLB</b>	Protocorm Like Body (Estructura Tipo Protocormo)
<b>RCV</b>	Reguladores del Crecimiento Vegetal
<b>2iP</b>	Isopentiladenina

## RESUMEN

*Laelia speciosa* es considerada una de las orquídeas más hermosas, debido a esto, es una de las más colectadas y vulnerables. Endémica de la República Mexicana, bajo protección especial y Amenazada, se puede encontrar una muy escasa población en el estado de Aguascalientes, localizada en zonas de difícil acceso y muy delimitadas, por lo que alguna alteración en su ambiente pone en peligro su subsistencia en este Estado. Por ello el presente trabajo pretende ayudar a garantizar su resguardo y fácil multiplicación haciendo uso de las herramientas que brinda la biotecnología a través del cultivo de tejidos vegetales. El objetivo principal es cultivar y propagar *in vitro* a *Laelia speciosa* (*orchidaceae*) a partir de material vegetal nativo del Estado de Aguascalientes. Para ello, se realizó de manera exitosa la germinación asimbiótica de semillas, en medio Murashigue & Skoog (MS). Se comparó la eficiencia de Benciladenia (BA), Isopentiladenina (2iP) y Metatopolina (MT) para la multiplicación de protocormos y se realizó un protocolo para su multiplicación a base de MS adicionado con  $1\text{mgL}^{-1}$  de 2iP. Se llevó a cabo la multiplicación de Estructuras Tipo Protocormo (PLB's – Protocorm Like Bodies) utilizando como medio de cultivo MS, MS adicionado con  $1\text{mgL}^{-1}$  de BA, MS con  $1\text{mgL}^{-1}$  de 2iP y MS con  $1\text{mgL}^{-1}$  de MT, encontrándose la misma eficiencia de multiplicación en los medios adicionados con BA y 2iP, y una importante organogénesis en los medios MS y MS con  $1\text{mgL}^{-1}$  de MT. Se multiplicó de forma exitosa a partir de Yemas axilares, probando diferentes concentraciones de citocininas y generando un protocolo de multiplicación empleando BA en medio MS a una concentración de  $3\text{mgL}^{-1}$ . Se determinó que el crecimiento y desarrollo de las plántulas de *L. speciosa* es favorable en medio MS y MS al 50% y no muestran diferencias significativas en su capacidad de aclimatación. Se prueba que un periodo en cámara aclimatación de ambiente controlado, ayuda a la adaptación a un ambiente de invernadero, obteniendo una supervivencia del 98.3% de las plantas, después de 60 días *ex vitro*.

## ABSTRACT

*Laelia speciosa* is considered one of the most beautiful orchids, that is why is one of the most collected and vulnerable. Endangered, specially protected, and endemic, there is a very small population in the state of Aguascalientes. Therefore, this paper aims to help ensure safekeeping and easy multiplication using the tools offered by biotechnology through plant tissue culture. The target is to grow and propagate in vitro *Laelia speciosa* (Orchidaceae) from Aguascalientes native plant material. To this end, seeds were asymbiotic germinated on Murashige and Skoog Media culture. There were compared the efficiency of protocorm multiplication, between Benzyl adenine (BA), Meta Topolín (MT) and Isopentyl adenine (2iP), and a protocol was developed to protocorm proliferation, using MS+1mgL<sup>-1</sup> 2iP as media culture. Protocorm like bodies (PLB's) were propagated in different media cultures, MS+1mgL<sup>-1</sup> BA and MS+1mgL<sup>-1</sup> 2iP showed high capacity of propagation, MS+MT and MS showed high organogenesis capacity and plantlets development. *L. speciosa* were successfully propagated from axillary buds, and a protocol was developed to axillary bud multiplication, using MS+3mgL<sup>-1</sup> BA as media culture. Also, it was observed that the growth and development of plants is similar in MS and MS 50%, and there are no significant differences between their survival rate. It is found that a period of acclimatization chamber controlled environment, helps adapting to a greenhouse environment, resulting in a 98.3% survival of plants after 60 days ex vitro.

## INTRODUCCIÓN

Grande ha sido siempre la fascinación que ejercen las plantas sobre la especie humana, no es únicamente la necesidad de alimentarse y obtener compuestos medicinales de ellas lo que favoreció la persistencia de su búsqueda y recolección, sino que ya desde hace mucho tiempo se colocaban flores, semillas y otros objetos en los entierros como parte de un ritual funerario complejo en neandertales <sup>[1]</sup>, hecho que permite vislumbrar el efecto que han logrado generar.

### IMPORTANCIA DE LAS ORQÍDEAS.

La familia *Orchidaceae*, fuera de estar alejada de esta búsqueda y recolección, ha sido objeto persistente de colecta por parte de los humanos, influidos por la necesidad de obtener productos útiles, pero también atraídos por el encanto de sus bellas flores. Descritas por vez primera por Teofrasto (370–285 A.C.), mencionadas posteriormente por Dioscórides (20–70 D.C.) y por Casius Plinius Secundus (23 ó 24-79 D.C.) en sus escritos, y algunas de ellas empleada en la antigua Mesopotamia para inducir la lactancia <sup>[2]</sup>.

Hay pocos registros de la época prehispánica en donde se ofrecen algunas referencias a la utilización de las orquídeas en ceremonias rituales de las culturas indígenas del norte de Colombia, Panamá y Costa Rica. Se han descubierto piezas de joyería de oro, que data probablemente del s.VIII, representando de forma sorprendente, los pétalos, sépalos y labelo de la *Oncidium cebolleta*, en El General, Costa Rica. La *O. cebolleta* era empleada por los pueblos precolombinos de México como alucinógeno, por su contenido de alcaloides, el grupo indígena Bribri de Costa Rica, le llama el símbolo de la lanza y lo utiliza como medicina para el dolor de cabeza, la tribu Chibcha del sur de Costa Rica lo emplea para aliviar cólicos <sup>[3]</sup>. El conocimiento azteca acerca de las orquídeas posiblemente les fue transmitido por civilizaciones anteriores, especialmente la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

maya. El hecho de que la mayoría de las especies de *Orchidaceae*, conocidas y utilizadas por los aztecas, se encuentren en áreas que aún muestran una gran evidencia actual de pertenecer a la cultura maya da fuerza a este argumento, además de que a hay registros arqueológicos un gran intercambio cultural, a través de la interacción comercial entre los aztecas y los mayas. Después de la llegada de los españoles a México, Fray Bernardino de Sahagún, desde su llegada en 1529, dedicó su vida a la observación y el estudio del lenguaje, costumbres e historia de los aztecas, entre 1547 y 1577 se dedicó a la escritura de "La Historia de las Cosas de la Nueva España" apoyado por estudiantes hablantes del Náhuatl, Español y Latín <sup>[3]</sup>.

Los habitantes prehispánicos de América Central utilizaron muchas orquídeas como plantas medicinales. *Catasetum maculatum* fue utilizado entre los mayas de Yucatán para curar llagas y tumores; se mencionan los usos medicinales de *Lockhartia pittieri* Schltr., *Oncidium cebolleta* y *Sobralia fragans* Lindl por los mayas en Belice. Entre los aztecas, *Arpophyllum spicatum* y *Encyclia pastoris* fueron utilizados contra la disentería. Los bulbos de *Euchile citrina* se han aplicado sobre las heridas infectadas, y las infusiones de *Laelia autumnalis* eran un remedio contra la tos. También fueron importantes varias especies que contienen sustancias mucilaginosas utilizadas para preparar productos aglutinantes o adhesivos, entre los que *Encyclia pastoris*, conocido en náhuatl como *tzacutli*, apreciada por sus características mucilaginosas. Sahagún lo describe de la siguiente manera: "Las ramas son delgadas. Tiene tallos. Su raíz es pegajosa, lo que se llama *tzacutli*, es un adhesivo. Para prepararlo, le cortan los pseudobulbos en rodajas y las secan al sol y luego los almacenan y cuando era el momento adecuado, les sumergen en agua para disolver el mucílago y darle diferentes usos. Este proceso estaba en manos de los aprendices. *Tzacutli* se utiliza como pegamento para elaborar adornos de plumas de las túnicas de los sacerdotes y como fijador para los pigmentos". Otras especies de orquídeas se utilizan para el mismo fin fueron *Bletia campanulata*, *B. coccinea* La Llave & Lex., *Cranichis speciosa* La Llave & Lex., *C. tubularis* La Llave & Lex., *Govenia Liliacea*, *G. superba* y *Laelia autumnalis*. *Laelia speciosa* y *L. autumnalis* y fueron y todavía son

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

utilizados en la fabricación de dulces durante las festividades del Día de los Difuntos (llamados comúnmente alfeñiques). Entre los mayas, se utilizaron los pseudobulbos de *Myrmecophila tibicinis* para ayudar durante el parto y fueron empleados como trompetas y flautas incluso en 1838, llamaron esta planta *Epidendrum tibicinis*, derivando su nombre de la palabra latina tibicen o trompetista <sup>[3]</sup> <sup>[4]</sup>.

Las primeras descripciones formales, conocidas de orquídeas en las Américas se encuentran en el herbario azteca de 1552, escrito en México con el título "*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*" su autor fue el médico azteca Martín de la Cruz, y fue traducido del náhuatl al latín por otro nativo llamado Juan Badiano. Conocido comúnmente como el *Códice Badiano* o *Códice Cruz-Badiano*. Es un texto médico completo, y también el primero y único texto mexicano de su clase salido a la luz. De acuerdo con este código, *tlixóchitl* (*Vanilla planifolia*), se utilizó con una mezcla de otras plantas en una receta para *viatores presidium*, a saber, "protección para los viajeros." Otra orquídea por el nombre *tzacouhxóchitl* (de *tzacouh*, "pegamento", y *xóchitl*, "flor"), reconocida como *Laelia speciosa*, fue utilizada como un adhesivo y también en una mezcla con *Bletia campanulata* o *Catasetum maculatum* prescrita para *timoris vel micropsychiae remedium*, que podría traducirse como "remedio contra la timidez". Las ilustraciones del *Códice Cruz-Badiano* también representan el primer intento en las Américas para coordinar las descripciones florísticas y médicas de las plantas con sus condiciones ecológicas. Las plantas se representan en su totalidad, es decir, incluyendo flores, hojas, tallos y raíces, y alrededor de las raíces hay varios símbolos pictóricos que, sin duda, se refieren a la ecología de la planta. Por lo tanto, una coloración de fondo azul indicaría que la planta creció cerca del agua; la relación entre las plantas y las hormigas se muestra por imágenes claras de estos insectos en las raíces de la planta, y así sucesivamente. Este código, por lo tanto, es una importante referencia para futuros trabajos sobre las orquídeas y su ecología en las Américas <sup>[3]</sup> <sup>[4]</sup>.

En el año de 1570 a cargo de Francisco Hernández (nombrado con el título de Primer Médico General de las Nuevas Indias, Islas y Tierra Firme) se llevó a cabo la primera expedición científica del nuevo mundo, trayendo instrucciones de "dibujar las hierbas y otras cosas naturales". Investigó y colectó la flora de México desde el punto de vista de un botánico y del 1570 al 1577, colectó más de 3000 plantas, 500 animales y 35 minerales. Sin embargo, el clasificó estas plantas de acuerdo a estándares aztecas, y sus descripciones eran vagas o breves,



**Figura 1.** Dos ilustraciones de orquídeas. Realizadas por Francisco Hernández, entre 1570 y 1577, contenidas en la edición de 1651, de *Thesaurus*. Nombradas de izquierda a derecha, *Coazintle coxochitl* (*Stanhopea hernandezii*) y *Chichiltic tepetlauxochitl* (*Laelia speciosa*). Imagen de Ossenbach, C. (2005).

aun así conservó una porción de etnobotánica que de no haber sido por él, se habrían perdido, regresando a España con 6 volúmenes de texto y 10, de ilustraciones, y les llamó "*Rerum Medicarum Novae Hispaniae Thesaurus, seu Plantarum, Animalium, Mineralium Mexicanarum Historia, or Natural History of New Spain*". Entre las plantas mencionadas hay cinco especies de Orquídeas, todas claramente ilustradas y descritas, son tlilxóchitl (vainilla), coatzonte coxóchitl (*Stanhopea hernandezii*), amazauhtli (*Oncidium* sp.), chichiltic tepelauhxóchitl (*Laelia speciosa*), y tzauxóchitl (*Laelia* sp. o *Encyclia* sp.). Por desgracia, sólo dos especies se pueden identificar con certeza (Figura 1). Los otros se ilustran sin flores, o con poco detalle<sup>[3]</sup>.

Pero no todo en la vida es para utilizarse. En el código Nutall se menciona el caso de los más importantes de todos los antiguos jardines de México, el de Huaxtepec, que Moctezuma había heredado de su antecesor Moctezuma el Viejo. Colocó a Pinotetl como supervisor principal, quien primero restaura sus canales y después envía mensajeros a la región de la costa tropical solicitando al Señor de Cuertlaxtla, las plantas con raíces de orquídeas de vainilla, cacao y árboles de magnolia, y muchas verduras valiosas. Descripción detallada de los

jardines de Huaxtepec dicen en estos jardines de flores Moctezuma no permiten cualquier tipo de verduras y frutas que se cultivan, diciendo que "no era propio de reyes cultivar plantas para la utilidad o ganancia, sino para complacencia, el sembrar huertos, era para esclavos o comerciantes". Además se hace mención de que en México los jefes indios asignaban un valor más alto a las flores de sus orquídeas dependiendo de su gran belleza, figura extraña y agradable perfume. *Stanhopea hernandezii* (Kunth) Schltr. y *S. tigrina* Batem. tenían un gran valor ornamental durante la época prehispánica y fueron llamados por los aztecas *coatzontecoxóchitl* o *coatzontemacoxóchitl*, porque sus flores se parecen cabezas de serpiente. *Artorima erubescens*, *Laelia anceps*, *L. autumnalis*, *L. speciosa*, y muchas especies de *Oncidium* se utilizaron también de manera ornamental <sup>[5]</sup>. En una hermosa descripción de 1722 hecha por el traductor del *Popol Vuh*, donde relata otro ejemplo del valor ornamental que tenían para los mayas en Guatemala: "Todas esas flores, aunque muchas y diversas, crecen de pequeñas cebollas, cuyas raíces se adhieren a la corteza de los robles como si estuvieran profundamente arraigados en la tierra y les crecen algunas hojas un poco gruesas, pero diferentes las unas de las otras. Y esas pequeñas cebollas, procedentes de esos árboles, son trasplantadas por muchos indios a sus casas, se pega a otro árbol y allí echa sus raíces y se conserva y da su flor. Y por lo que tienen los árboles de sus casas llenas de flores diferentes, que se traen de la selva"<sup>[3]</sup>.

Esta atracción por las orquídeas ha trascendido a diferentes estratos poblacionales, incluyendo al mundo científico, donde se han empleado los recursos disponibles para poder mantenerlas, multiplicarlas y estudiarlas más a profundidad, de tal modo que su propagación ha ido siempre a la vanguardia de la biotecnología existente en el momento; en 1849, David Moore diseñó el primer método de germinación de semillas de orquídea, revolucionando así la forma en que se germinaban otros tipos de semillas en ese tiempo. Medio siglo después Noël Bernard, desarrolló un método de germinación simbiótico *in vitro*, siendo éste probablemente el primer método de propagación *in vitro* de cualquier planta empleando, lo que en su tiempo, fueron los procedimientos microbiológicos más

avanzados, y predijo que vendría un día cuando los cultivadores de orquídeas tendrían laboratorios como parte de sus establecimientos, haciéndose esto realidad, no únicamente para las orquídeas, sino también para otras plantas. Lewis Knudson, en 1921, fue el primero en establecer un procedimiento práctico para la propagación de plantas *in vitro* en un medio axénico, al germinar de manera asimbiótica semillas de orquídea, el cual fue un método innovador conceptual y tecnológicamente hablando, que abrió paso a la biotecnología moderna [2]. Charles Darwin escribió en una carta dirigida a Hooker: "Nunca estuve más interesado en mi vida en cualquier tema que [en] esto de las orquídeas", y escribió como fruto de este interés "The various contrivances by which orchids are fertilised by insects" y "On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects, and on the good effect of intercrossing"<sup>[6]</sup>.

### **LAS ORQUÍDEAS Y SU PROBLEMÁTICA.**

Lamentablemente, con todo el interés que despiertan aunado a la escasa capacidad de autocontrol y planeación por parte del ser humano, se ha comprometido a varias especies de orquídeas y a sus hábitats. Notemos, que el tráfico de orquídeas del nuevo al viejo mundo inició más formalmente en 1731, y que su cultivo comercial se desarrolló hacia 1821, representando una ventana de tiempo donde, no cesó la recolección de orquídeas, para abastecer un creciente mercado internacional. Aún hoy el tráfico ilegal de individuos representa un serio problema para nuestro país. En un estudio publicado, en 2002 se menciona que en México el tráfico ilegal de orquídeas entre los años de 1993 a 1996 se estimó de entre 9 y 12 millones de plantas para las especies silvestres con valor ornamental el factor esencial de su destrucción ha sido la colecta excesiva en los hábitats naturales para abastecer el mercado de especies de orquídeas en Estados Unidos, Europa y Japón; a pesar de las leyes vigentes que prohíben estas prácticas las plantas continúan colectándose y exportándose [7]. Además en otro estudio realizado en Veracruz, publicado en el 2007, se monitoreó un punto de

venta ilegal en Xalapa, Veracruz, por 85 semanas, a 27 comerciantes, 207 especies y 7.598 plantas – 19 especies ya reportadas para México, pero no para Veracruz, otras 2 recolectadas en Veracruz, pero nunca antes reportadas para México. Alrededor del 47% de las orquídeas epífitas de Veracruz son objeto de comercio ilegal. Se comercializaron 27 especies protegidas por la legislación mexicana, junto con 41 especies endémicas de México y seis endémicas de Veracruz <sup>[8]</sup>.

Estimaciones recientes sugieren, que la Familia *Orchidaceae* se compone de cerca de 30,000 especies y continuamente se descubren algunas nuevas y en general los países tropicales no están lo suficientemente bien estudiados, como para asegurar el tamaño de la flora de orquídeas. Ellas, han podido establecerse en casi todos los ambientes terrestres, gracias a sus adaptaciones para soportar distintos ambientes, poseen la capacidad de hacer un uso muy eficiente del agua y los nutrientes, y pueden habitar lugares donde éstos son un factor limitante, por ejemplo la asociación de hongos y orquídeas, ya sea durante la germinación o a lo largo de su vida, es un mutualismo en el que la orquídea obtiene nutrientes y compuestos de carbono. Si algo las caracteriza es la complejidad de sus interacciones con otros seres vivos, sean estos hongos micorrízicos, polinizadores, árboles hospederos u hormigas mutualistas; de hecho son por mucho el grupo de plantas que ha podido colonizar con más éxito las copas de los árboles y varias de sus adaptaciones más notables están asociadas al epifitismo o a su capacidad de establecerse en ambientes restrictivos. Exhibe asimismo notables especializaciones de polinización, sistemas avanzados de almacenamiento de agua en las estructuras llamadas pseudobulbos; tienen una particular complejidad floral con un solo propósito, atraer con una aguda eficiencia a los polinizadores, gracias a los que podrá producir sus semillas y perpetuar su especie. La flora orquideológica de México comprende más de 1,200 especies y subespecies, distribuidas en 164 géneros. Una de sus características más sobresalientes es la alta proporción de endemismos, ya que se han registrado 444 especies o subespecies endémicas que corresponden aproximadamente a 40% del total de taxa registrados para México. De estas, 191

especies se encuentran en alguna categoría de riesgo, de acuerdo con la norma oficial vigente NOM-059-SEMARNAT-2010. La extracción ilegal es un importante factor de disminución de las poblaciones naturales. Las orquídeas se concentran generalmente en áreas muy específicas, que son importantes por la riqueza y diversidad de sus poblaciones o por sus endemismos. Se estima que en México existen seis áreas muy diversas, con menos de 100 000 ha cada una, localizadas en diferentes regiones florísticas del país, las cuales poseen 50% del total de orquídeas registradas y que representan tan sólo 0.003% del territorio mexicano<sup>[9][10][12][13]</sup>.

En México es grande la riqueza y el volumen de comercio ilegal de epífitas, alto; de hecho, el volumen de las orquídeas comercializadas de manera ilegal (sólo el documentado) es igual al volumen promedio anual de las exportaciones legales. El comercio ilegal de epífitas se produce en todo el mundo, por lo que es importante y necesario, el aumento de las medidas de protección, juntamente con el desarrollo de formas sostenibles de cosechar epífitas<sup>[8]</sup>.

### **ESTRATEGIAS DE CONSERVACIÓN.**

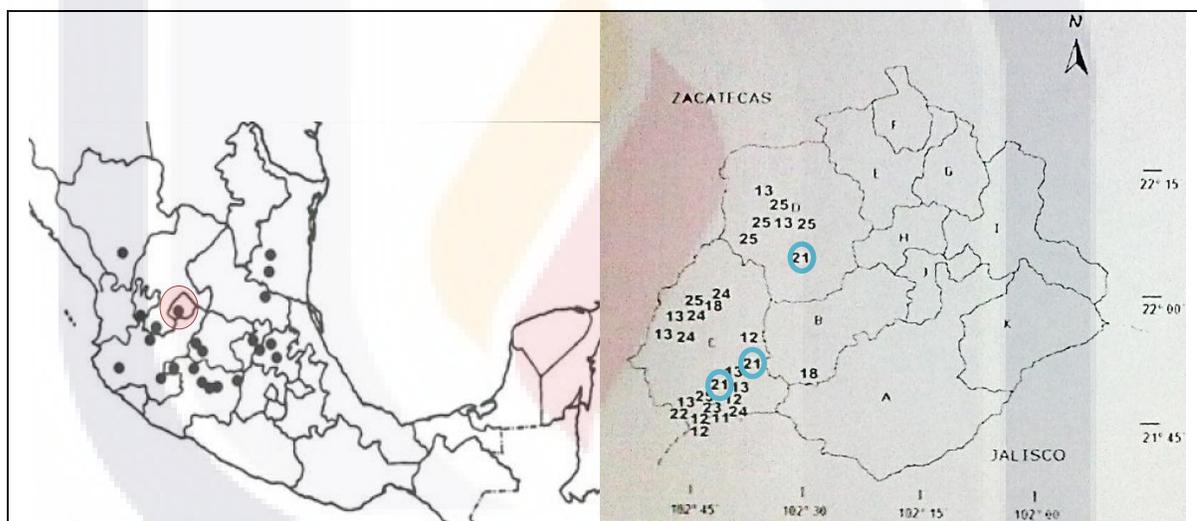
Hay dos tipos de estrategias de conservación, *In situ* y *Ex situ*. La conservación *In situ* se refiere al mantenimiento de las especies en su ambiente original, es la ideal y la más importante, pues permite la variación genética de las especies, así como conservar el delicado equilibrio de sus interacciones con otros organismos y la posibilidad de seguir evolucionando. La permanencia de las orquídeas en la naturaleza, depende de la conservación de grandes áreas con sus ambientes primarios u originales intactos, pues no existen muchas orquídeas en lugares deforestados; lo delicado viene cuando los ambientes originales son de pequeña extensión, y son refugio de plantas y animales (lugares pedregosos, laderas abruptas, acantilados, bosques de galería). El norte de México posee, grandes extensiones de lugares primarios, pero por sus condiciones de sequía, las poblaciones de orquídeas son muy bajas. El mantenimiento de este tipo de

conservación requiere de manera indispensable la cooperación y compromiso de los habitantes de la zona, y aunque es difícil de obtener, hay ejemplos exitosos en nuestro país, como por ejemplo, reservas de la biósfera de Chamela-Cuixmala y Calakmul, los bosques comunitarios de la Unión Chinanteco-Zapoteca, en el norte del estado de Oaxaca y el Monumento Natural Bonampak, manejado por los lacandones. La estrategia de conservación *Ex situ* tiene dos principales variantes, la propagación y el mantenimiento de las especies que ya no pueden subsistir en la naturaleza, y otra modalidad que comprende la propagación masiva y subsecuente comercialización de especies, por la mayor cantidad de personas posible, que es de suma importancia ya que reduce y desalienta la colecta de ejemplares en la naturaleza. Un buen ejemplo de ello se está dando con *Laelia anceps*, pues las plantas de los viveros que se consiguen con facilidad, son de tan buena calidad, por ser descendientes de especímenes sobresalientes seleccionados, premiados por asociaciones de cultivadores, que muy pocos aficionados colectarían o comprarían un planta silvestre. La conservación *Ex situ* no es nueva en México, recordemos los ejemplos anteriores de *Stanhopea hernandezii*, *Vanilla sp.*, en jardines de nobles aztecas y en los jardines de Moctezuma, además del cultivo tradicional en los jardines de los mayas, mencionado por el traductor del *Popol Vuh*. El cultivo tradicional, por ejemplo ha permitido la subsistencia de 2 tipos de orquídeas que no se han encontrado actualmente en la naturaleza, la *Laelia gouldiana* y la *Laelia anceps* sbsp. *dawsonii* f. *chilapensis*, y otra muy apreciada internacionalmente, casi extinta en su ambiente natural *Laelia anceps* subsp. *dawsonii* f. *dawsonii*, también preservada por el cultivo tradicional <sup>[11]</sup>.

### **ORQUÍDEAS EN AGUASCALIENTES.**

En un estudio realizado a la familia *Orchidaceae* en el estado de Aguascalientes, donde se recolectó individuos, durante un año y medio, se determinó que se contaba con 30 especies y 13 géneros (*Alamania punicea* Lex., *Bletia ensifolia* L.O. Williams, *Bletia gracilis*, *Bletia jucunda*, *Bletia reflexa*,

*Brachystele* aff. *minutiflora*, *Brachystele polyantha*, *Dichromanthus aurantiacus*, *Dichromanthus cinnabarinus*, *Govenia liliácea*, *Greenwoodia sawyeri*, *Habenaria* aff. *crassicornis*, *Habenaria clypeata*, *Habenaria guadalajarana*, *Habenaria jaliscana*, *Habenaria quinqueseta*, *Habenaria odontopetala*, *Habenaria strictissima*, *Habenaria virens*, *Hexalectris grandiflora*, ***Laelia speciosa***, *Malaxis abiarticola*, *Malaxis brachystachys*, *Malaxis myurus*, *Malaxis novogaliciana*, *Malaxis soulei*, *Malaxis tamayoana*, *Oncidium graminifolium*, *Plantanthera brevifolia*, (*Schiedeella michuacana*) de los cuales 21 eran nuevos registros. De las 30, la única para la que se registró ser endémica de la República Mexicana, amenazada y especie poco abundante en el estado, fue *Laelia speciosa*, encontrándose ella en pocos sitios de la Sierra Fría y Sierra del Laurel (Figura 2) [12].



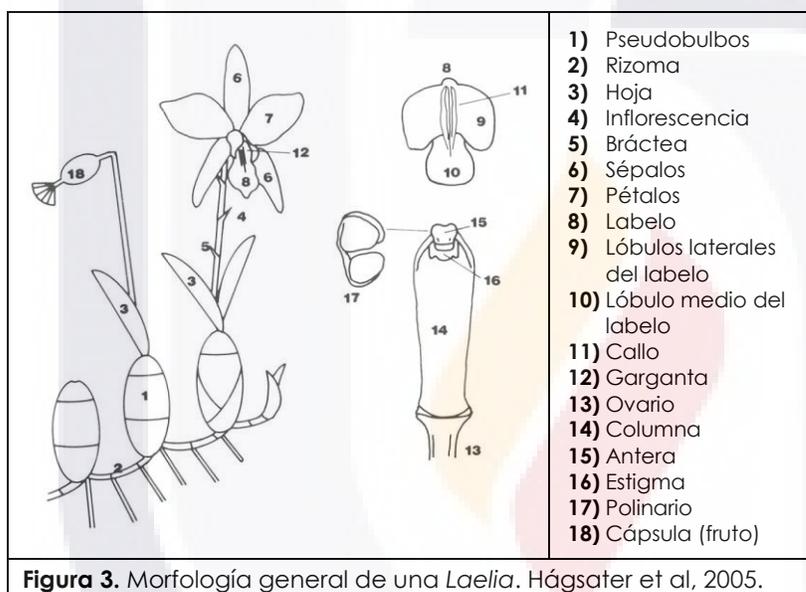
**Figura 2.** Localización de *Laelia speciosa* en el estado de Aguascalientes. A la izquierda, se muestra la distribución geográfica conocida para *Laelia* s. reportada por Halbinger y Soto (1997). Encerrado en un círculo sombreado de rojo se marca el estado de Aguascalientes, del que se muestra una ampliación a la derecha, donde se señalaron la ubicación de *Laelia speciosa*, bajo los puntos marcados con el número 21., que en la figura se observan encerrados por un círculo azul. Y corresponden a los municipios de Calvillo (C) y San José de Gracia (D). Macías et al. (2005)

La razón por la que se concentran tanta representación en las porciones NW y SW del estado, es porque ahí se encuentran los principales sistemas montañosos de la región (La Sierra Fría y La Sierra del Laurel), y al ser bosques de encino, pino-encino y mesófilo, y muchas orquídeas muestran afinidad por este tipo de vegetación, lamentablemente se encuentran expuestos a las perturbaciones

causadas por la actividad humana, por lo que dentro de las recomendaciones del estudio está el de impulsar el cultivo y propagación, en particular de las especies que actualmente están amenazadas por su inadecuado manejo, al ser indiscriminadamente colectadas, debido a su interés hortícola [12].

**EL GÉNERO *Laelia*.**

El género *Laelia* incluye algunas de las consideradas más hermosas



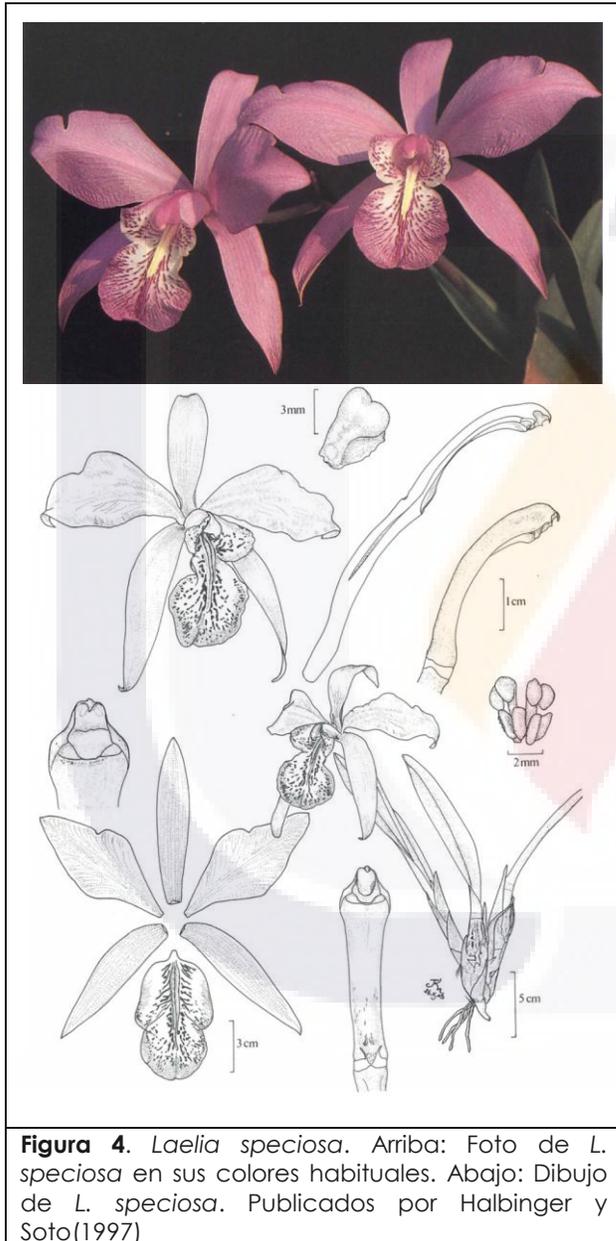
orquídeas cultivadas, es típicamente mexicana y tradicionalmente de las más excepcionales. Han sido cultivadas y apreciadas por la gente del país, particularmente por diversos grupos indígenas, desde Chihuahua, hasta Chiapas. Estas plantas

**Figura 3.** Morfología general de una *Laelia*. Hágsater et al, 2005.

han adornado patios y son ofrendadas en ceremonias religiosas y otras festividades durante siglos, de ahí se deriva nombres como “calaverita”, “lirio de todos los santos”, “flor de muerto”, “flor de las ánimas”, etc. Durante el siglo XIX, eran enviadas a Europa donde se colocaron en lugares favoritos de conservatorios [14]. Su morfología general se representa en la Figura 3[14].

**LA ORQUÍDEA *Laelia speciosa*.**

Nombres comunes: Flor de mayo, flor grande, flor de Corpus, *tlacuxóchitl*, deantzá (Purépecha), *itzámahua* (Purépecha), *chichiltictepetzacu-xóchitl* (Náhuatl antiguo)



**Figura 4.** *Laelia speciosa*. Arriba: Foto de *L. speciosa* en sus colores habituales. Abajo: Dibujo de *L. speciosa*. Publicados por Halbinger y Soto(1997)

Planta herbácea epífita o raramente litófito, formando masas compactas de 15 a 30 cm de alto; rizoma corto a inconspicuo; pseudobulbos subglobosos a ovoides, formados por 2 ó 3 entrenudos, verdes claros, rugosos cuando viejos, de 3 a 6 cm de largo, de 1.5 a 3 cm de grosor, cubiertos por vainas escariosas, blanquecinas, de 1 a 4.5 cm de largo; una a dos hojas, lanceolado-elípticas, coriáceas, de 10 a 20 cm de largo, de 1 a 2.5 cm de ancho, agudas; inflorescencia originándose del brote en desarrollo, erecta a ligeramente arqueada, de 13 a 20 cm de largo, pedúnculo corto, delgado, algo comprimido, de 1 a 3 mm de ancho, con una bráctea basal, tubular, triangular, escariosa, de 2 cm a 3.5 cm de largo, aguda, brácteas florales más cortas que el ovario, abrazadoras, escariosas, 1.5 a 2 cm de largo, de 3 a 7 mm de ancho,

agudas; una o dos flores, sépalos y pétalos de color rosa o rosa-púrpura, labelo blanco, con los márgenes frecuentemente coloreados, con manchas y rayas purpúreas variables, callo con una quilla media amarilla brillante, las laterales

blanquecinas, algunas veces con puntos de color magenta; ovario subrollizo, ligeramente engrosado hacia el ápice, de 3.5 a 5 cm de largo, de 1 a 2 mm de grosor; sépalos extendidos, lanceolados, de 5.5 a 7 cm de largo, de 1 a 2 cm de ancho, agudos, los laterales oblicuos; pétalos extendidos, elíptico-rómbicos, de 6 a 8 cm de largo, de 2 a 3.5 cm de ancho, agudos, margen ligeramente irregular, frecuentemente recurvados; labelo de 3 a 5.5 cm de largo, de 3 a 4 cm de ancho, lóbulos laterales erectos, cubriendo ligeramente a la columna, oblongos, margen reflexo, lóbulo medio obovado a ovado, redondeado a emarginado, deflexo, margen ondulado, callo formado por 3 quillas longitudinales, desde la base hasta la mitad del labelo, la central más larga; columna ligeramente arqueada, sin alas, claviforme, de 2.5 a 3.5 cm de largo, de 7 a 9 mm de ancho; antera ovoide-subcuadrada, 8-locular; cápsula elipsoide, de 4 a 6 cm de largo, de 2 a 3 cm de grosor <sup>[10]</sup> <sup>[14]</sup>.

**Reconocimiento.** *Laelia speciosa* es considerada una de las más bellas especies del género, y quizás una de los más destacadas de todas las orquídeas. Las plantas son epífitas, más bien pequeñas, con pseudobulbos globulares u ovoides que llevan una dura hoja terminal. La inflorescencia es de 15 a 25 cm de largo, con 1-2 flores muy grandes que miden 10-16 cm de diámetro, de color rosa pálido a oscuro-lila a púrpura coloración. Los sépalos son lanceolados y los pétalos son del doble de su anchura, el labelo es de color blanco en el centro, el lóbulo medio del labelo es casi redondo, color de rosa-lila en los bordes, blanco en el medio, mostrando patrones de puntos y rayas color magenta-púrpura. Las flores tienen una fragancia débil que se asemeja al de las violetas. Floración de abril a Julio.

**Estado de conservación.** Bajo protección especial. *Laelia speciosa* es una de las cuatro orquídeas mexicanas en esta categoría, junto con *Encyclia citrina*, *E. vitellina* y *Barkeria scandens*. A pesar de que hoy en día hay localidades con un gran número de plantas, algunos sitios se han explotado de forma que las plantas han casi llegado a desaparecer localmente. Miles de plantas se venden en las calles y mercados de las ciudades mexicanas. Los niños y los campesinos reúnen

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

las plantas en floración de las poblaciones silvestres, con consecuencias muy graves para la producción de semillas para este tipo de poblaciones. En algunas zonas de recolección, no se ha observado, durante años, la aparición de nuevas plantas generadas por semillas. La demografía comparativo de poblaciones intactas y explotadas de *Laelia speciosa* ha sido estudiado y se ha llegado a la conclusión de si este tráfico ilegal continúa, muchas poblaciones serán exterminados en un futuro próximo. <sup>[14]</sup>

### **CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.**

La forma en que abordaremos esta situación será a través de la propagación *in vitro*. Con base en el principio de la "totipotencialidad\* de las células vegetales" postulada por Gottlieb Haberlandt, y en el principio de la "plasticidad"\*\*, el cultivo de tejidos vegetales (CTV) es un conjunto de técnicas que se llevan a cabo con la finalidad de establecer, mantener y desarrollar cualquier parte de una planta, desde una célula hasta un organismo completo, bajo condiciones artificiales, axénicas y controladas. Representa una herramienta insustituible e invaluable, ya que ofrece una serie de sistemas y modelos ideales para investigación fisiológica, bioquímica, genética y estructural. Para lograr un cultivo exitoso se debe poner atención en el tipo de explante que se desea cultiva, además del medio de cultivo en el que se colocará, teniendo en cuenta que la composición del mismo influirá en el tipo de respuesta que muestre el explante ante él (contenido de sales, vitaminas, fuentes de Nitrógeno, gelificante, Reguladores del Crecimiento Vegetal), además de la realización del mismo bajo condiciones asépticas. En lo que al control hormonal del crecimiento y desarrollo *in vitro* se refiere, se ha encontrado que los reguladores del crecimiento vegetal (RCV – compuestos orgánicos sintetizados por la propia planta) empleados en muy pequeñas cantidades alteran el crecimiento y los patrones de desarrollo de los tejidos vegetales, lo que nos permiten poder influir en ellos dependiendo de lo que se desee obtener del tejido en cultivo<sup>[20] [21]</sup>.

El empleo de este tipo de tecnologías se ha utilizado en orquídeas desde que fueron diseñadas. Se han empleado yemas axilares para regeneración de plántulas de *Laelia anceps* [22], explantes de hoja para obtener plántulas de *Oncidium Gower Ramsey*[23], y puntas de raíz como explante para *Oncidium varicosum*[24]. Desde principios de 1800 se intentaba su germinación, y se entrelazaron estos intentos, con los orígenes de la biotecnología, a través de los Noel Bernard, que consiguió una germinación simbiótica *in vitro*, pero con Knudson, la forma de germinar *in vitro* tuvo un gran impulso tras conseguir un germinación asimbiótica y estableciéndola en un medio de cultivo que se continúa empleando hasta el día de hoy[2], actualmente se llevan a cabo estudios de comparación de germinación simbiótica y asimbiótica [25], se orientan algunos esfuerzos en germinar semillas de orquídeas amenazadas, tanto brasileñas[26], como de México [16], en todos ellos el objetivo comparar medios y RCV, para determinar el más eficiente, pero también se comparan las formas más adecuadas de desinfección y su relación con la viabilidad de las semillas. Se han regenerado plantas a partir de cultivo de protoplastos [27], embriogénesis somática a partir de tejido calloso en *Cymbidium twilight moon*[28] y *Dendrobium*[29]. Adicionalmente estas técnicas también ayudan a la producción de extractos, con la obtención de *Vanilla planifolia* a través explantes obtenidos de yemas axilares, para la obtención del extracto de vainilla [30]. Con el fin de proteger las siguientes orquídeas amenazadas se ha establecido un medio de cultivo y multiplicación: *Brassia verrucosa* [31], *Encyclia adenocaula* [32], *Oncidium stramineum* Lindl. [33], *Laelia halbingeriana* [34], *Guarianthe skinneri* [35], todas ellas mexicanas. La obtención de híbridos somáticos mediante el uso de protoplastos[27] representa el obtener individuos con floraciones de formas y colores más exuberantes. Y hoy en día se está probando la encapsulación de embriones para la generación de semillas artificiales con *Laelia anceps* ssp. *dawsonii* [36].

Al momento se han realizado estudios que buscan paliar de alguna forma la problemática, buscando soluciones en la biotecnología para la propagación,

mantenimiento y aclimatación de la orquídea *L. speciosa*. A continuación se enlistan y se habla de ellos.

- 2004. Tesis de Licenciatura, en la que se germinó *in vitro* semillas de *L. speciosa*, en donde se busca evaluar el efecto del ácido giberélico (GA), extracto de plátano y carbón activado en la germinación de las semillas de *L. speciosa*, además de evaluar el efecto de la luz en la germinación. Se encontró: a) que hay una mayor eficiencia en utilizar cápsula cerrada, y madura; b) a una mayor intensidad de luz, la germinación es más rápida y el desarrollo de las plantas también; c) Los protocormos se desarrollan mejor en medios si ácido giberélico, y se encontró al medio Knudson con extracto de plátano mas útil. <sup>[15]</sup>
- 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, entre ellas *L. speciosa*. En este estudio se germinaron semillas y se emplearon segmentos de hoja, pseudobulbos y PLB's como explantes. Se empleó el medio MS y se adicionó diferentes concentraciones de ácido naftalenacético (ANA), Benciladenina (BA) y GA: a) Se indujo producción de callo; b) proliferación de PLBs, se desarrollaron y se obtuvieron plántulas; c) Se considera que se obtuvo medios óptimos para *L. speciosa*. (Desarrollo: MS + 0.1ANA+0.5GA) (Inducción de callo: MS+0.5ANA+2.5BA) (Multiplicación de protocormos: MS+0.1ANA+0.5BA) (Regeneración de plántulas: MS+0.1ANA+0.05BA+0.1GA) RCV en mgL<sup>-1</sup>. <sup>[16]</sup>
- 2007. Conservación genética de *L. speciosa*. en el que se pretendía hacer un estudio sobre las características genéticas, para enfocarse más en la protección de poblaciones, cuyas características genéticas lo ameritaran. Se encontró que: a) Se observaron muy bajos niveles de variación genética, en las poblaciones estudiadas (la más cercana a la que es objeto de nuestro estudio era la correspondiente al estado de Jalisco); b) Se encontró correlación entre poblaciones pertenecientes al mismo sistema montañoso; c) Para reintroducción emplear individuos propagados de semillas de las más cápsulas posibles de poblaciones cercanas; d) También se sugiere conservación *ex situ*. <sup>[17]</sup>

- 2010. Formación de Callo y regeneración de Plantas en *L.speciosa*. en donde se lleva a cabo un experimento en el que se forma callo derivado de las hojas y se siembra en medio MS y se le adicionan 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y cinco concentraciones (0.0, 0.25, 0.5, 1.0, y 2.5 g L<sup>-1</sup>) de ANA en combinación con BA (0.0, 0.25, 0.5, 1.0, y 2.5 g L<sup>-1</sup>). Se encuentra que: a) Se obtuvo callo en el medio MS suplementado con 2.5 mg L<sup>-1</sup> BA; b) El mejor desarrollo de PLB's se encontró en el medio MS + 2.5 mg L<sup>-1</sup> ANA and 1 mg L<sup>-1</sup> BA; c) La formación de plántulas se logró con éxito en MS + 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ANA y 0.1 mg L<sup>-1</sup> de GA; d) 70% de dichas plántulas fueron aclimatadas exitosamente en invernadero. <sup>[18]</sup>
- 2011. Aclimatación de *L. speciosa*. Se propone como alternativa para su conservación la micropropagación *in vitro*, y para hacer menos problemático el periodo de aclimatación se usó un periodo de preaclimatación, en condiciones de invernadero. Las plántulas se incubaron 20 días en condiciones de invernadero antes de aclimatación *ex vitro* también mostró el mayor crecimiento con una tasa de supervivencia del 97,5% -100%. Las plántulas del medio MS tuvieron la tasa más alta de supervivencia y vigor para aclimatarse. <sup>[19]</sup>

## CAPÍTULOS

### JUSTIFICACIÓN

---

La población actual de la Orquídea *Laelia speciosa*, en el Estado de Aguascalientes es escasa y además sus integrantes, están ubicados en zonas geográficas muy pequeñas. Esto exacerba su carácter de "amenazada" y la vuelve endeble. Por lo que es conveniente el establecer una metodología de cultivo *in vitro* eficaz para la propagación de individuos de esta, para contribuir a solventar grado de amenaza que se vierte sobre ella. Como ventaja adicional, el establecer una metodología eficaz para la micropropagación y generación de individuos capaces de ser adaptados al ambiente externo, abre la posibilidad de satisfacer la demanda existente de estas plantas, ayudando así a atenuar el saqueo y la colecta ilegal.

### HIPÓTESIS

---

Se podrá cultivar y propagar *in vitro* a la orquídea *Laelia speciosa*, a partir de material vegetal nativo del Estado de Aguascalientes, y posteriormente, las plántulas obtenidas podrán ser aclimatadas y transferidas a condiciones *ex vitro* de forma favorable.

### OBJETIVOS

---

#### General:

→ Cultivar y propagar *in vitro* a *Laelia speciosa* (orchidaceae) a partir de material vegetal nativo del Estado de Aguascalientes.

### **Específicos:**

- Germinar semillas de *Laelia speciosa* de manera asimbiótica.
- Desarrollar un método para la multiplicación *in vitro* de protocormos procedentes de semilla.
- Determinar las condiciones óptimas para la conversión de protocormos en plántulas.
- Desarrollar un protocolo para la multiplicación *in vitro* de plantas a partir de yemas axilares.
- Determinar cuál es el medio de cultivo más efectivo para el crecimiento y desarrollo de las plantas generadas *in vitro*.
- Determinar cuál es el método más efectivo para la aclimatación y transferencia a condiciones *ex vitro* de las plántulas obtenidas.

## **METODOLOGÍA**

---

### **Germinación de semillas de manera asimbiótica.**

*Material.* De cápsulas obtenidas de plantas nativas del estado de Aguascalientes, se obtuvieron las semillas que fueron previamente colocadas en tubos de 2 ml para microcentrífuga en campana de flujo laminar.

*Desinfección.* Se realizaron 2 lavados con 1ml de solución de hipoclorito de sodio comercial al 15% por cada tubo, se agitó vigorosamente durante 1 minuto, por cada lavado. Se hicieron 3 enjuagues con agua destilada estéril (igualmente, agitando 1 minuto en forma vigorosa, por cada enjuague). Se centrifugó cada tubo 30 segundos entre cada paso, para poder recuperar la solución de lavado o enjuague con una micropipeta con puntas estériles. No se retira el agua estéril del último lavado, para generar una suspensión de semillas.

*Germinación.* Posterior a la desinfección, se llevó a cabo la siembra de 50  $\mu\text{l}$  de la suspensión previa de semillas para cada frasco con medio Murashigue y Skoog<sup>(37)</sup> gelificado con 3  $\text{gL}^{-1}$  de Phytigel. Se colocaron en cuarto de incubación a fotoperiodos de 16:8 (Lámparas de luz fluorescente, 54  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a temperatura constante de 24°C. Se tomaron fotos de manera periódica para observar evolución.

### **Multiplicación *in vitro* de protocormos procedentes de semillas.**

De los protocormos obtenidos tras la germinación, se colocaron 48 en 4 diferentes tratamientos (12 protocormos para cada uno de los tratamientos). El primer tratamiento consistió en MS gelificado con 3  $\text{gL}^{-1}$  de Phytigel (medio base y testigo); el segundo tratamiento consistió en MS adicionado con 1  $\text{mgL}^{-1}$  de Benciladenina (BA); el tercer tratamiento fue MS más 1  $\text{mgL}^{-1}$  Isopentiladenina (2iP); el cuarto tratamiento fue MS más 1  $\text{mgL}^{-1}$  Meta-topolina (MT).

El cultivo se llevó a cabo en la campana de flujo laminar, bajo condiciones estériles. Posteriormente, se colocaron en cuarto de incubación a fotoperiodos de 16:8 (Lámparas de luz fluorescente, 54  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a temperatura constante de 24°C, donde permanecieron 3 meses, durante los cuales se llevó a cabo registro fotográfico para valor y analizar resultados.

### **Multiplicación *in vitro* de Estructuras Tipo Protocormo (Protocorm Like Bodies – PLB's).**

Del material vegetal previamente establecido *in vitro*, se obtuvieron PLB's, los cuales fueron sometidos a cuatro tratamientos distintos (12 PLB's para cada uno de los tratamientos). El primer tratamiento consistió en MS gelificado con 3  $\text{gL}^{-1}$  de Phytigel (medio base y testigo); el segundo tratamiento consistió en MS adicionado con 1  $\text{mgL}^{-1}$  de Benciladenina (BA); el tercer tratamiento fue MS más

1mgL<sup>-1</sup> Isopentiladenina (2iP); el cuarto tratamiento fue MS más 1mgL<sup>-1</sup> Metatopolina (MT).

El cultivo se llevó a cabo en la campana de flujo laminar, bajo condiciones estériles. Posteriormente, se colocaron en cuarto de incubación a fotoperiodos de 16:8 (Lámparas de luz fluorescente, 54  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a temperatura constante de 24°C, donde permanecieron 3 meses, durante los cuales se llevó a cabo registro fotográfico para valor y analizar resultados.

### **Multiplicación *in vitro* a partir de yemas axilares.**

El primer tratamiento consistió en la colocación de explantes obtenidos de cultivos ya establecidos *in vitro* de *Laelia speciosa*, procedentes de material vegetal nativo del estado de Aguascalientes, en medios con diferente concentración de BA, descritas a continuación. Se prepara medio base al que se adicionó BA en concentraciones de: 0 (control), 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 mgL<sup>-1</sup>. Se prepararon 7 frascos para cada tratamiento, y en cada frasco se colocaron 5 explantes (plántulas a las que se elimina la raíz).

El segundo tratamiento consistió en adicionar, al medio basal, distintas concentraciones de 2iP (0, 1, 2 y 3 mgL<sup>-1</sup>), preparándose 7 frascos por tratamiento y en cada frasco se colocaron 5 explantes sin raíz.

En el tercer tratamiento se preparó medio base adicionado con diferentes concentraciones de MT (0, 1, 2 y 3 mgL<sup>-1</sup>) y se prepararon 7 frascos para cada tratamiento, colocándose 5 explantes sin raíz en cada uno.

Todos los tratamientos fueron colocados en cuarto de incubación a fotoperiodos de 16:8 (Lámparas de luz fluorescente, 54  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a temperatura constante de 24°C. Donde permanecieron 60 días, y posteriormente se contabilizaron los brotes, para registrar los Brotes por Explante (BPE), llevándose a cabo un análisis estadístico de los resultados con ANOVA y Test de Tukey.

### **Crecimiento y desarrollo de plántulas obtenidas *in vitro*.**

Se colocaron plántulas obtenidas *in vitro*, de entre 2 y 3 cm de altura, a las que se separó de su extremo radical, en los siguientes medios: MS, MS adicionado con Carbón Activado a una concentración de  $2\text{gL}^{-1}$  y MS al 50%. Se realizaron 8 frascos para cada tratamiento, con 6 explantes por frasco. Se colocaron en cuarto de incubación a una temperatura constante de  $24^{\circ}\text{C}$  con fotoperiodo de 16:8 durante 90 días. Posteriormente se tomaron medidas de la longitud de la hoja más larga, diámetro de los brotes generados (y se sumaron para dar un diámetro total de todos los brotes obtenidos por explante) y se contó el número de raíces generadas por cada explante. Se analizaron llevó a cabo el análisis estadístico correspondiente.

### **Aclimatación.**

De las plántulas obtenidas previamente para desarrollo y crecimiento, se separaron 30 de las expuestas al medio MS y 30 de las expuestas a medio MS al 50%. Para iniciar el proceso de adaptación, previo a la colocación en sustrato se retiró el sellado del frasco y se abrió ligeramente para permitir la ventilación y permitir el cambio progresivo del ambiente interno de los frascos, y facilitar el proceso de adaptación de la planta al ambiente externo; a los 7 días de la apertura del frasco se extrajeron las plantas y se lavaron para retirar de las raíces todo residuo del medio de cultivo, así pues, 10 de cada uno de los medios (20 en total) fueron colocadas en sustrato comercial, a base de turba y corteza de pino (Mezcla para orquídeas marca Vigoro), otras 10 de cada medio, en Peat moss y finalmente 10 más de cada uno de los medios se colocó en una mezcla 1:1 de Vigoro y Peat moss. Se colocó una planta por maceta con su respectivo sustrato húmedo, y se cubrieron con bolsa de plástico cerrada en cámara de aclimatación de ambiente controlado, con fotoperiodo de 16:8, a una temperatura constante de  $24^{\circ}\text{C}$ , y humedad relativa del 60%. Donde durante 10

días se mantuvo cerrada la bolsa, y al 11° día se abrió, pero aún se mantuvieron en la cámara de aclimatación durante 10 días más, cuidando que los sustratos se mantuvieran húmedos. A los 20 días en cámara de incubación de ambiente controlado, se procedió a trasladar a las plantas a invernadero, pero se cerró nuevamente la bolsa para continuar con ambiente húmedo por 5 días más, al 6° día en invernadero se abrió la bolsa y se cuidaba que el sustrato se mantuviera húmedo, permanecieron así con la bolsa abierta 15 días más. Se tomaron fotografías del proceso al día 30 y 60 para analizar los resultados.



## RESULTADOS Y DISCUSIONES

---

### **Germinación de semillas de manera asimbiótica:**

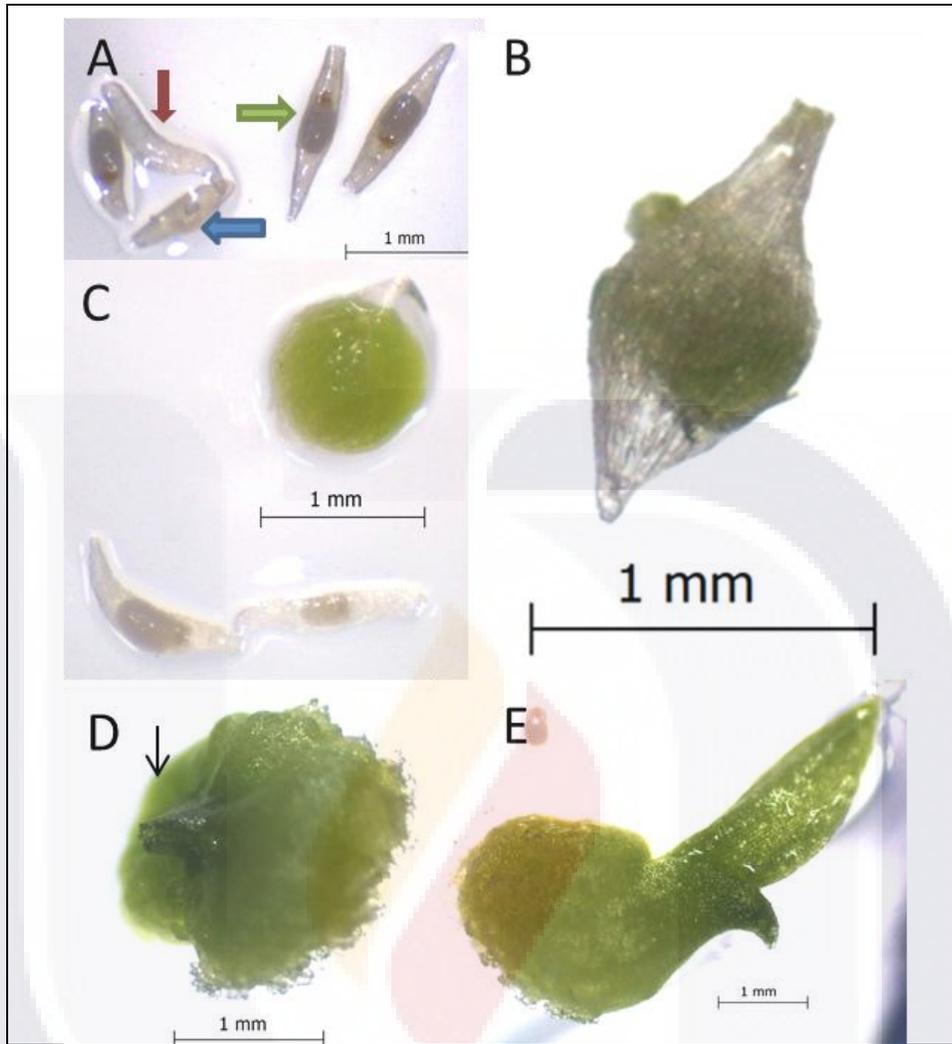
Se encuentra que hay germinación de algunas de las semillas a partir del día 40, lo cual es compatible con lo reportado en artículos referentes al tema <sup>[16]</sup> <sup>[38]</sup> <sup>[39]</sup>. Además, se encontró que el desarrollo de los protocormos a plántulas es normal, pues atraviesa por las etapas ya descritas, como la imbibición (Figura 5A), donde el embrión se presenta hinchado por la absorción de agua, avanzando hacia el crecimiento del embrión hasta formar una pequeña esfera verde brillante aún dentro de la testa, llamada semilla verde (Figura 5B), generando lo que algunos autores consideran la germinación, que es la salida del protocormo temprano (Figura 5C) a través de la testa (pues hay otros que consideran que la germinación se lleva a cabo desde la etapa de imbibición), para posteriormente ser un protocormo tardío (Figura 5D) con la formación incipiente de hojas y posteriormente una plántula con desarrollo de la protoráiz (Figura 5E).

En el presente trabajo se encontró un porcentaje muy bajo de germinación, probablemente a que las semillas con las que se trabajó, no eran recientes, sino producto de una colecta previa, también, es importante señalar que se ha mencionado que durante la fecundación y maduración de los frutos, mantenerlos en ambientes húmedos y cálidos provoca semillas inviables<sup>[40]</sup>. Se ha reportado previamente para *Laelia speciosa* la presencia de semillas sin embrión (al igual que en la figura 5A, señaladas por una flecha roja) procedentes de cápsulas ya maduras<sup>[38]</sup>, y en *Laelia albida* la presencia de semillas sin embrión, en donde se atribuye este fenómeno a diversos factores ecofisiológicos y de variabilidad genética<sup>[41]</sup>; y algunos otros problemas para la viabilidad de las semillas de *L. speciosa*, como es que al ser una especie con un sistema de apareamiento mixto tiende a la exogamia<sup>[42]</sup> y ante la disminución de individuos se pueden generar problemas de endogamia, también se señala que en frutos verdes de *L. speciosa*, en su mayoría, las semillas contenían embriones viables y en frutos amarillentos y

dehiscentes carecían de embrión, atribuyéndose a que esta planta requiere de un agente polinizador externo para su reproducción sexual<sup>[43]</sup>.

Se germina pues de manera exitosa, un porcentaje mínimo de las semillas sembradas, pero son suficientes para llevar a cabo los experimentos subsecuentes con protocormos.

De los 240 frascos sembrados, se encontró contaminación en 3 de ellos, debida a hongos, es decir en el 1.25% de los casos, y en ningún caso el crecimiento del hongo inició en el centro del medio de cultivo, sino en la periferia, adherida o muy cercana a la pared del frasco y se presentó de 15 a 30 días después del sembrado. Por ello se considera que el proceso de desinfección de las semillas fue adecuado. En otros estudios se reportan mayores tiempos de lavado en hipoclorito de sodio al 15% (15 min)<sup>[38]</sup>, o procesos más complicados de desinfección, que incluyen la colocación de las semillas en papel filtro, lavado de 1 minuto en etanol al 70%, lavado de 30 min en solución al 30% de hipoclorito de sodio comercial con 2 gotas de Tween-80 por cada 100ml<sup>[44]</sup>; pero en el presente trabajo se encuentra que 2 lavados de 1 minuto con hipoclorito de sodio comercial al 15%, y 3 enjuagues de 1 minuto con agua destilada estéril, es suficiente para llevar a cabo la desinfección de las semillas.

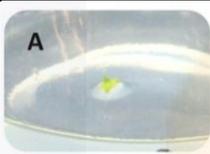
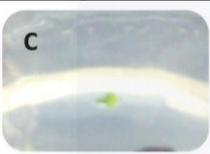
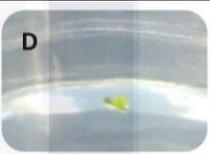
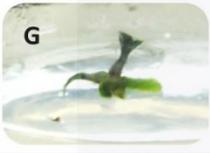


**Figura 5.** Germinación asimbiótica de Semillas. Fotomicrografías obtenidas con microscopio estereoscópico de la germinación y desarrollo de protocormos de *Laelia speciosa* nativa de Aguascalientes.

**A:** Se observan la imbibición de las semillas (→) siendo visible el embrión dentro de la testa, además de una semilla sin embrión (↓) y una semilla sin imbibición, con embrión no viable (←) a los 8 días de la siembra. **B:** Estadío de Semilla verde, aún cubierta por la testa próxima a la germinación, a los 25 días de la siembra. **C:** Protocormo inicial a los 40 días de la siembra. **D:** Protocormo Tradío con desarrollo foliar inicial (↓) a los 60 días de la siembra. **E:** Plántula, con desarrollo radical incipiente, a los 80 días de la siembra.

**Multiplicación *in vitro* de protocormos procedentes de semillas:**

En la Figura 6 se observan después de establecidos los protocormos, en medios MS, MS+1mgL<sup>-1</sup>BA, MS+1mgL<sup>-1</sup>2iP y MS+1mgL<sup>-1</sup>MT. Los protocormos sembrados en Medio MS han presentado una mayor altura que todos aquellos expuestos a algún RCV, y aunque, si bien, generaron nuevas plántulas, fue en menor cantidad que los expuestos a BA y a 2iP; y los expuestos a MT, si presentaron mayor multiplicación que los de MS sin RCV, pero en menor cantidad que BA y 2 iP. En cambio las plántulas obtenidas con 2iP, aunque si produjeron hojas y raíces, se encontró que eran de menor tamaño (aproximadamente de un tercio) que las obtenidas en MS y MS+MT (Figura 6F).

	Medio y Regulador del Crecimiento Vegetal empleado.			
	MS	MS + 1 mgL <sup>-1</sup> BA	MS + 1 mgL <sup>-1</sup> 2iP	MS + 1 mgL <sup>-1</sup> MT
Tras la siembra				
40 días después de la siembra				
120 días después de la siembra				

**Figura 6.** Multiplicación de Protocormos Procedentes de Semillas. Se observa la respuesta, a través del tiempo, de los protocormos ante el regulador del crecimiento vegetal adicionado al medio.

En el medio adicionado con 2iP, se presentó mayor multiplicación que en cualquier otro medio, y la presencia de nuevos PLB's (Aunque la presencia de PLB's se encontró también en todos los otros medios, aunque en menor medida). En los 4 tratamientos se encontró que todos los protocormos evolucionaron satisfactoriamente a plántulas, pero los que mayor tamaño obtuvieron, fueron en

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

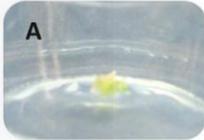
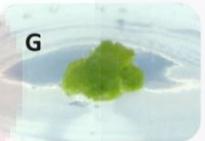
primer lugar los sembrados en MS y en segundo lugar los sembrados en MS+MT. Además es interesante notar que ante la estimulación inducida por las citocininas adicionadas al medio nunca hay formación de tejido indiferenciado como tal, sino que se presenta la generación de PLB's, como se aprecia en la Figura 6K, donde se observan las pequeñas esferas verdes.

No hubo pérdidas por contaminación en los cultivos de protocormos.

Se reporta previamente que la mejor combinación de RCV para la multiplicación *in vitro* de *L. speciosa* a través de protocormos es de MS adicionado con  $0.1\text{mgL}^{-1}$  ANA y  $0.5\text{mgL}^{-1}$  BA [16], y en otro estudio para la orquídea *Guarianthe skinneri* se reporta el mayor número de brotes a partir de protocormos en la siguiente combinación de RCV: de  $16,1\ \mu\text{M}$  de ANA,  $17,1\ \mu\text{M}$  de AIA,  $6,3 \times 10^{-9}\ \mu\text{M}$  de  $\text{GA}_3$  y  $0,0023\ \mu\text{M}$  de BA[35], para *Oncidium* se se recomienda utilizar MS suplementado con  $100\text{mL}^{-1}$  de agua de coco,  $40\ \text{gL}^{-1}$  de extractos de manzana, plátano y jitomate,  $2\text{gL}^{-1}$  de peptona y  $200\ \text{mgL}^{-1}$  de polivinil pirrolidona[45]; cabe mencionar que en ninguno de los anteriores es evaluada la respuesta ante 2iP, que es la que muestra aquí una mayor cantidad de brotes y nuevos PLB's, y además para la simplificación del protocolo de multiplicación, para facilitar el proceso, se pretende evitar la complicación injustificada y reducir en la medida de lo posible el uso concomitante de RCV.

**Multiplicación *in vitro* de Estructuras Tipo Protocormos (Protocorm Like Bodies – PLB's):**

En la Figura 7, se pueden observar las respuestas de los PLB's a través del tiempo, que en comparación con los protocormos obtenidos de semilla, son de mayor tamaño. Además mostraron una respuesta mucho más rápida e intensa, que los protocormos, pues a los 40 días después de su colocación en el medio (Figura 7 E, F, Gy H) se apreciaba la gran diferencia en contraste con la respuesta de los protocormos al tras el mismo periodo de tiempo (Figura 6 E, F, G y H).

	Medio y Regulador del Crecimiento Vegetal empleado.			
	MS	MS + 1 mgL <sup>-1</sup> BA	MS + 1 mgL <sup>-1</sup> 2iP	MS + 1 mgL <sup>-1</sup> MT
Tras la siembra				
40 días después de la siembra				
120 días después de la siembra				

**Figura 7.** Multiplicación de PLB's (Protocorm Like Bodies). Se observa la respuesta, a través del tiempo, de los PLB's ante el regulador del crecimiento vegetal adicionado al medio.

En cuanto a la diferenciación, se muestra en la Figura 7E la presencia de hojas y raíces, en los PLB's sembrados únicamente en MS, mientras que en las Figuras 7F (MS+BA) y 7G (MS+2iP) se observa mayor proliferación de PLB's, y nuevamente MS+MT se observa una respuesta intermedia, pues a demás de presentar nuevos PLB's, hay también desarrollo de hojas y raíces.

Al igual que en los protocormos, las plántulas sembradas en medio MS mostraron mayor desarrollo de hojas y raíces y al mismo tiempo, claramente más altura y mayor grosor (Figura 7 I), mientras que en los medios en los que se añadió MT, 2iP y BA, aunque los PLB's mostraron regeneración de hojas y raíces, no lo

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

hicieron de forma simultánea ni regular, y las plántulas obtenidas eran de menor envergadura.

De los medios en los que se empleó alguna citocinina, aquel en el que se observó la formación de hojas y raíces de mayor tamaño y grosor, fue en el medio MS adicionado con MT (Figura 7L), mientras que en los medios con BA y 2iP se observó mayor generación de PLB's, con cantidad similar de multiplicación; e igualmente se observó que las plántulas regeneradas en estos medios eran muy pequeñas y delgadas. En contraste con lo reportado para *Laelia anceps* donde se observa formación de tejido calloso ante la combinación de ANA, AIA y BA, y donde el mejor medio para la regeneración de plantas fue el adicionado con BA, AIA, Myo-inositol, Sacarosa y Carbón Activado<sup>[46]</sup>. En otro estudio se reportó que para inducir organogénesis de los PLB's se subcultivaron en medio MS, en donde se presentó la formación paulatina de brotes adventicios y de raíces, aunado al crecimiento de la plántula <sup>[47]</sup>.

La multiplicación mostrada en todos los frascos de PLB's en contraste con la mostrada por protocormos es mucho más profusa, notoria a simple vista 4 meses después de su siembra, además de que su biomasa aumenta considerablemente más rápido que la de los protocormos, y es interesante notar que los protocormos, que proceden de semillas, deben adaptarse al cultivo *in vitro*, mientras que los PLB's han sido obtenidos ya en estas condiciones de cultivo, y probablemente el estar adaptados a este medio, les permite poder hacer un uso más eficiente del mismo. Podría ser necesario en un futuro llevar a cabo estudios comparativos entre la capacidad de aclimatación entre plántulas obtenidas de protocormos y plántulas regeneradas de PLB's. Tras los 120 días que permanecieron en el medio, se observaron signos de deshidratación en los PLB's y plántulas que no se encontraban en contacto con el medio, debido a que la generación de nuevos protocormos, en las partes inferiores los alejaba del medio de cultivo, por ello no es recomendable que permanezcan sin subcultivar por más de 2 meses, pues la multiplicación es relativamente rápida.

No se tuvo pérdidas por contaminación en el cultivo de PLB's.

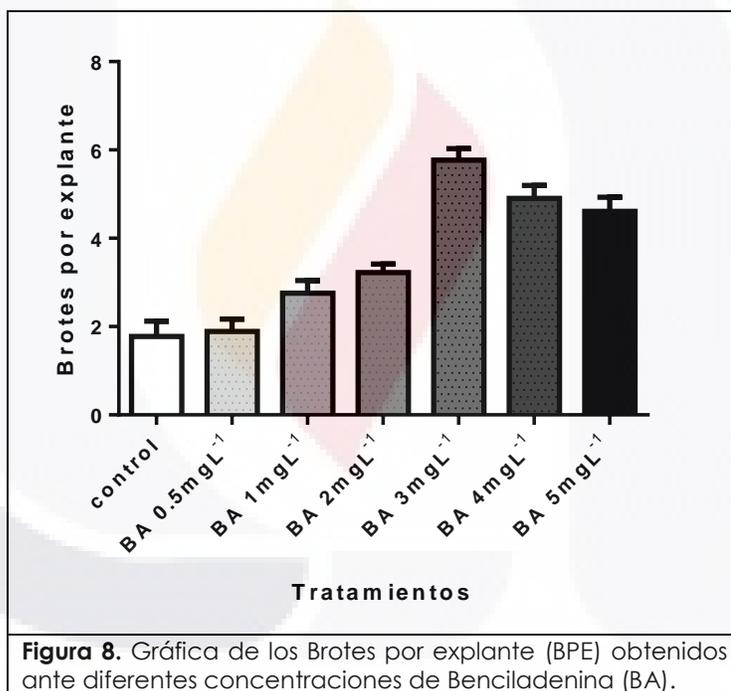
Para *Laelia anceps*, se reporta que tras el tercer subcultivo en un medio MS adicionado con  $2\text{mgL}^{-1}$  ANA,  $2\text{mgL}^{-1}$  BA,  $2\text{mgL}^{-1}$  Kinetina y  $2\text{mgL}^{-1}$  AIA, de PLB's se obtiene un promedio de 524 embriones somáticos<sup>[46]</sup>, también se reporta la micropropagación de PLB's para la multiplicación masiva de *Phalaenopsis* en cultivos de inmersión temporal <sup>[48]</sup>, y junto a lo obtenido para *L. speciosa* demuestra la gran utilidad que presentan los PLB's para la rápida multiplicación masiva *in vitro*, y esto aunado a su gran capacidad regenerativa, lo vuelven una muy importante opción para el cultivo *in vitro* de *Laelia speciosa*, por las ventajas que presenta en cuanto a tiempo, cantidad e inversión de recursos.



**Multiplicación *in vitro* a partir de yemas axilares.**

Respuesta a diferentes concentraciones de BA en el medio:

Al realizar el análisis estadístico al número de BPE (Brotos Por Explante), para cada uno de los tratamientos con BA se encuentra que el promedio de BPE va en aumento con relación al aumento de la concentración de la BA en el medio de cultivo (Figura 8), es decir, para el medio testigo (MS sin BA) se encuentra que el promedio de BPE es de 1.779, mientras que para la concentración de 0.5mgL<sup>-1</sup> de BA es de 1.893 , para 1mgL<sup>-1</sup> BA es de 2.757 y para 2mgL<sup>-1</sup> es de 3.221 (Tabla 1). Por lo que se decidió aumentar las concentraciones de BA en el medio (a concentraciones de 3, 4 y 5 mgL<sup>-1</sup> de BA).



Y se encontró que el promedio de los BPE (son el producto de la división de los Brotos Totales, entre los Explantes sin necrosis de cada tratamiento) para la concentración de 3mgL<sup>-1</sup> BA, fue de 5.773, para 4mgL<sup>-1</sup> BA de 4.90, y para 5mgL<sup>-1</sup> BA de 4.607 BPE (Tabla 1).

Tratamiento	Explantos Sin Necrosis por frasco	Brotos Totales por frasco	BPE	BPE Media ± EE
0 mgL <sup>-1</sup> BA	4	3	0.75	1.779 ± 0.3421
	5	8	1.6	
	4	14	3.5	
	4	9	2.25	
	4	7	1.75	
	5	8	1.6	
	5	5	1	
0.5 mgL <sup>-1</sup> BA	5	8	1.6	1.893 ± 0.2765
	4	8	2	
	4	6	1.5	
	5	9	1.8	
	5	14	2.8	
	4	14	2.8	
1 mgL <sup>-1</sup> BA	5	3	0.75	2.757 ± 0.2877
	5	12	2.4	
	5	13	2.6	
	4	6	1.5	
	5	14	2.8	
	5	16	3.2	
	5	14	2.8	
2 mgL <sup>-1</sup> BA	5	20	4	3.221 ± 0.1957
	5	15	3	
	4	10	2.5	
	4	13	3.25	
	4	12	3	
	5	15	3	
	5	19	3.8	
3 mgL <sup>-1</sup> BA	5	26	5.2	5.773 ± 0.2546
	5	34	6.8	
	3	18	6	
	4	19	4.75	
	4	25	6.25	
	3	17	5.66	
	4	23	5.75	
4 mgL <sup>-1</sup> BA	4	22	5.5	4.90 ± 0.2936
	5	25	5	
	3	12	4	
	5	25	5	
	5	30	6	
	5	19	3.8	
	4	20	5	
5 mgL <sup>-1</sup> BA	5	20	4	4.607 ± 0.3208
	4	25	6.25	
	5	22	4.4	
	5	25	5	
	5	18	3.6	
	5	22	4.4	
5	23	4.6		

**Tabla 1.** Datos obtenidos del experimento con Benciladenina a diferentes concentraciones en el medio de cultivo para multiplicación por Yemas Axilares. Muestra el total de brotes sin necrosis, de los 35 sometidos a cada tratamiento, además del conteo de Brotos Totales, tras 60 días de exposición.

Y se observa que los explantes sometidos a concentraciones más altas inician un descenso en la generación de brotes, además que las raíces son más delgadas y pequeñas en los explantes sometidos a concentraciones de más de  $4\text{mgL}^{-1}$  de BA. Aun así, casi duplican los obtenidos a concentraciones de  $2\text{mgL}^{-1}$  de BA. Es decir que a partir de una concentración mayor a  $5\text{mgL}^{-1}$  se deduce una acción dañina a la plántula, derivada del exceso de BA en el medio y se encuentra que la concentración útil para la obtención de mayor cantidad de BPE utilizando BA es de  $3\text{mgL}^{-1}$ .

Tras aplicar a los datos obtenidos la prueba de ANOVA, se encuentra evidencia suficiente para afirmar que hay diferencia significativa entre las medias de los tratamientos al obtener un valor de  $p\ 4.58 \times 10^{-11}$  (Tabla 2).

Tratamiento	Df	SS	Mean Sq	F	P
Residual	6	101.5	16.92	29.76	$P < 0.0001$
Total	42	23.8	0.5685		
	48	125.4			

**Tabla 2.** Resultados de la prueba de ANOVA aplicada a los datos obtenidos ante los tratamientos con diferentes concentraciones de BA en el medio.

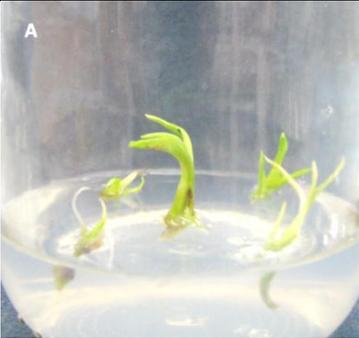
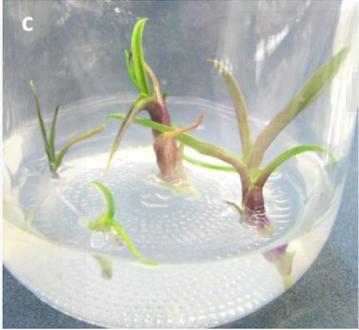
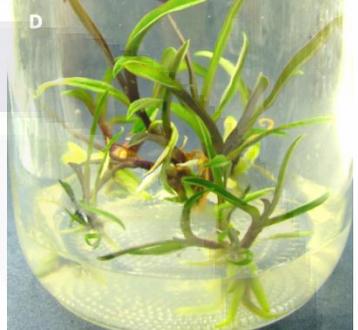
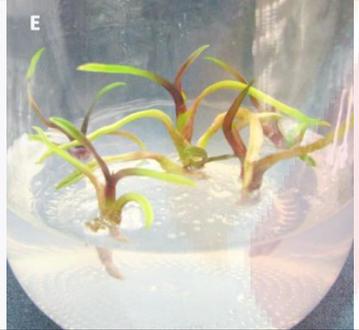
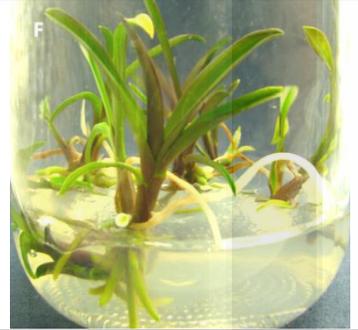
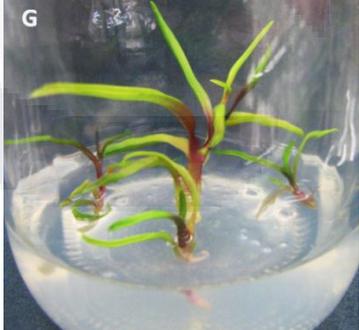
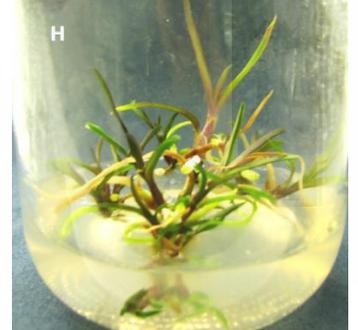
Y después de aplicar el Test de Tukey podemos observar las medias significativamente diferentes entre sí (Tabla 3). Entre las cuales destaca que la media de BPE para la concentración de  $3\text{mgL}^{-1}$  BA que se muestra como la más efectiva, es diferente al control, al  $0.5$ ,  $1$  y  $2\ \text{mgL}^{-1}$ . Y no es diferente a  $4$  y  $5\ \text{mgL}^{-1}$ , pero si muestran ellas la desventaja de la oxidación y la alteración ya mencionada en la formación de raíces que se mencionarán más adelante.

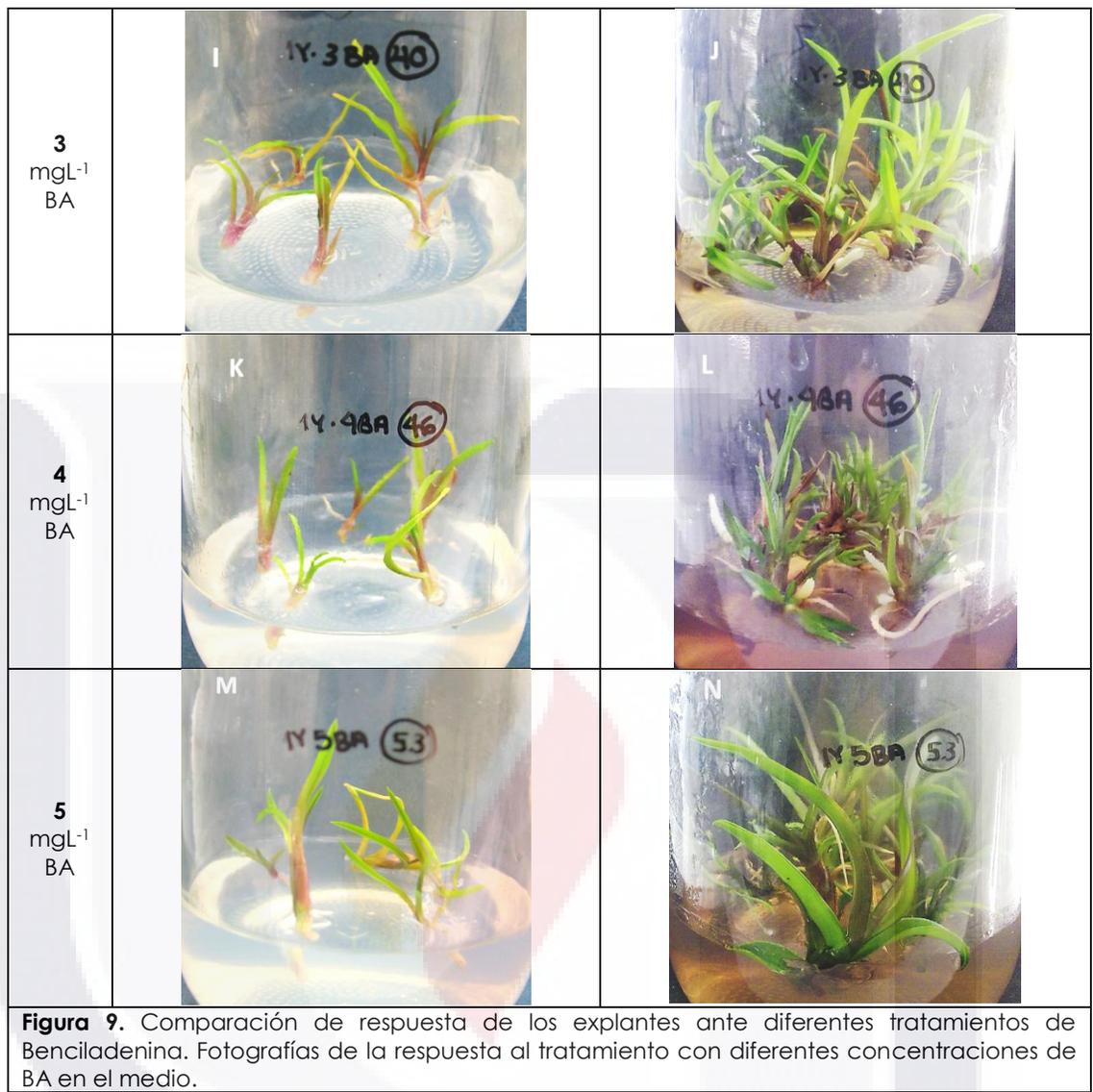
Medias Comparadas	Valor p
BA0.5-BA0	0.9896
BA1-BA0	0.0955
BA2-BA0	0.0057
BA3-BA0	0.0000
BA4-BA0	0.0000
BA5-BA0	0.0000
BA1-BA0.5	0.3802
BA2-BA0.5	0.0413
BA3-BA0.5	0.0000
BA4-BA0.5	0.0000
BA5-BA0.5	0.0000
BA2-BA1	0.9281
BA3-BA1	0.0000
BA4-BA1	0.0001
BA5-BA1	0.0013
BA3-BA2	0.0000
BA4-BA2	0.0043
BA5-BA2	0.0293
BA4-BA3	0.3802
BA5-BA3	0.1029
BA5-BA4	0.9919

**Tabla 3.** Resultados del Test de Tukey aplicado a los datos obtenidos ante diferentes concentraciones de BA. Muestra el resultado del Test de Tukey; se encuentran sombreadas las medias que son significativamente diferentes entre sí.

En la Figura 10 se observan fotografías de los explantes sometidos a diferentes concentraciones de BA. Figura 10A, los explantes tras la colocación en el medio MS. Figura 10B, los mismos explantes que en la fotografía previa, 60 días después de su siembra en el medio MS sin BA. Figura 10C, explantes tras la siembra en medio MS más  $0.5\text{mgL}^{-1}$  de BA. Figura 10D, los mismos explantes que en la fotografía previa, 60 días después de la siembra en medio MS con  $0.5\text{mgL}^{-1}$  de BA. Figura 10E, explantes tras la siembra en medio MS más  $1\text{mgL}^{-1}$  de BA. Figura 10F, los mismos explantes que en la fotografía previa, 60 días después de la siembra en medio MS con  $1\text{mgL}^{-1}$  de BA. Figura 10G, explantes tras la siembra en medio MS más  $2\text{mgL}^{-1}$  de BA. Figura 10H, los mismos explantes que en la fotografía previa, 60 días después de la siembra en medio MS con  $2\text{mgL}^{-1}$  de BA. Figura 10I, explantes tras la siembra en medio MS más  $3\text{mgL}^{-1}$  de BA. Figura 10J, los mismos explantes que en la fotografía previa, 60 días después de la siembra en medio MS con  $3\text{mgL}^{-1}$  de BA. Figura 10K, explantes tras la siembra en medio MS más  $4\text{mgL}^{-1}$  de BA. Figura 10L, los mismos explantes que en la fotografía previa, 60 días después de la siembra en medio MS con  $4\text{mgL}^{-1}$  de BA. Figura 10M, explantes tras la siembra en medio MS más  $5\text{mgL}^{-1}$  de BA. Figura 10N, los mismos explantes que en la fotografía previa, 60 días después de la siembra en medio MS con  $5\text{mgL}^{-1}$  de BA.

Las respuestas de los explantes muestra diferencias constantes ante las diferentes concentraciones de BA, una de ellas es la escasa formación de raíces, y las que fueron formadas eran muy delgadas y cortas en el medio con mayor concentración de BA (Figura 9N,  $5\text{mgL}^{-1}$ ), pero en todos los casos hubo formación de raíces. La inhibición de la producción de raíces se ha atribuido a una alta concentración de citocininas en el medio, que a pesar de conservarse la capacidad inductora de brotes adventicios, se ve inhibida la formación de raíces<sup>[44]</sup>. Además en estos medios también se observó una coloración parda en el medio, probablemente por oxidación fenólica. Por lo demás, las plantas mostraban similitud en altura y grosor entre las diferentes concentraciones de BA.

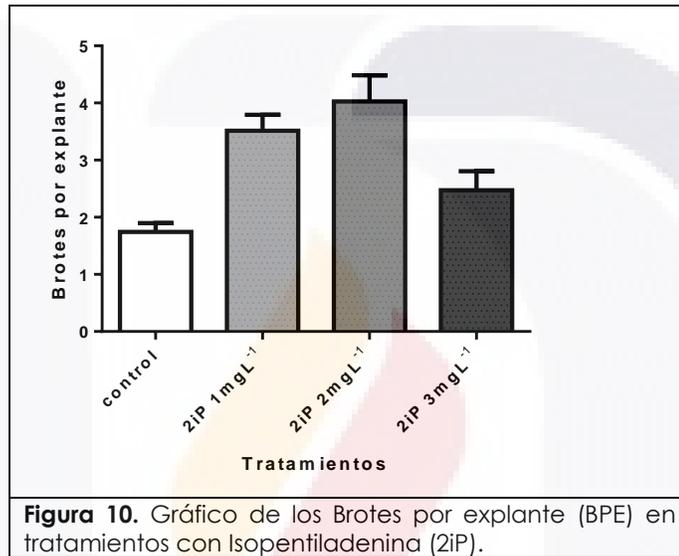
	Al sembrar	60 días Después de la Siembra
<b>0</b> mgL <sup>-1</sup> BA	 <p>A</p>	 <p>B</p>
<b>0.5</b> mgL <sup>-1</sup> BA	 <p>C</p>	 <p>D</p>
<b>1</b> mgL <sup>-1</sup> BA	 <p>E</p>	 <p>F</p>
<b>2</b> mgL <sup>-1</sup> BA	 <p>G</p>	 <p>H</p>



Es de notar la tasa de multiplicación obtenida en medio MS control (es decir sin RCVañadido), donde se ha observado que se producen 1.7 BPE. Dicha fenómeno de generación de brotes en ausencia de un RCV añadido al medio había sido ya reportado con anterioridad [16].

Respuesta a diferentes concentraciones de 2iP en el medio:

En la figura 10 se observa un incremento en la cantidad de BPE, ante el aumento en la concentración de 2iP en el medio, hasta llegar a la concentración de  $2\text{mgL}^{-1}$ , pero hay un descenso brusco ante la concentración de  $3\text{mgL}^{-1}$ , es decir, que se encuentra un límite de dosis efectiva ( $2\text{mgL}^{-1}$ ) para volverse dosis nociva ( $3\text{mgL}^{-1}$ ).



En la Tabla 4 se muestra el total de explantes sin necrosis, de los 35 explantes sometidos a cada tratamiento (5 explantes por frasco, 7 frascos por tratamiento), además del conteo de Brotos Totales, tras 60 días de exposición al medio. Al final los Brotos por Explante (BPE) se obtienen de la división de los Brotos Totales, entre los Explantes sin necrosis de cada tratamiento.

Para el control (MS) se encuentra una media de BPE de 1.743. Para el medio MS+ $1\text{mgL}^{-1}$  de 2iP la media de BPE es de 3.514. Para MS+ $2\text{mgL}^{-1}$  de 2iP la media de BPE es de 4.029. Para el medio MS+ $3\text{mgL}^{-1}$  de 2iP la media de BPE es de 2.471. Aparentemente se observa superioridad en el medio MS+ $2\text{mgL}^{-1}$ .

Tratamiento	Explantos Sin Necrosis por frasco	Brotos Totales por frasco	BPE	BPE Media ± EE
0 mgL <sup>-1</sup> 2iP	5	7	1.4	1.743 ± 0.1556
	5	8	1.6	
	5	10	2	
	5	12	2.4	
	5	6	1.2	
	5	8	1.6	
	5	10	2	
1 mgL <sup>-1</sup> 2iP	5	18	3.6	3.514 ± 0.279
	5	23	4.6	
	5	11	2.2	
	5	18	3.6	
	5	20	4	
	5	17	3.4	
	5	16	3.2	
2 mgL <sup>-1</sup> 2iP	5	15	3	4.029 ± 0.4565
	5	17	3.4	
	5	26	5.2	
	5	30	6	
	5	14	2.8	
	5	17	3.4	
	5	22	4.4	
3 mgL <sup>-1</sup> 2iP	5	9	1.8	2.471 ± 0.3334
	5	17	3.4	
	4	11	2.75	
	5	17	3.4	
	5	6	1.2	
	5	15	3	
	4	7	1.75	

**Tabla 4.** Datos obtenidos del tratamiento con Isopentiladenina (2iP) a diferentes concentraciones en el medio de cultivo para multiplicación por Yemas Axilares.

Tras el análisis estadístico de los datos con la prueba ANOVA (Tabla 5), se encuentra evidencia para afirmar que hay diferencia significativa entre las medias obtenidas de los BPE para cada concentración de 2iP (valor p 0.0002).

	Df	SS	MS	F	P
Tratamiento	3	22.17	7.391	10.02	0.0002
Residual	24	17.71	0.7379		
	27	39.88			

**Tabla 5.** Resultados de la prueba de ANOVA aplicada a los datos obtenidos ante el tratamiento con diferentes concentraciones de 2iP en el medio.

Tras la aplicación del Test de Tukey se pueden observar en la Tabla 6 las medias significativamente diferentes entre sí en las celdas sombreadas. Es interesante notar que aunque se encuentra una cantidad mayor de BPE para la concentración de  $2\text{mgL}^{-1}$  (4.029), que para  $1\text{mgL}^{-1}$  (3.514), no son estadísticamente diferentes entre sí, por lo que se puede afirmar pues, que la concentración mínima, más efectiva para la generación de BPE, es de  $1\text{mgL}^{-1}$  de 2iP añadida al medio MS.

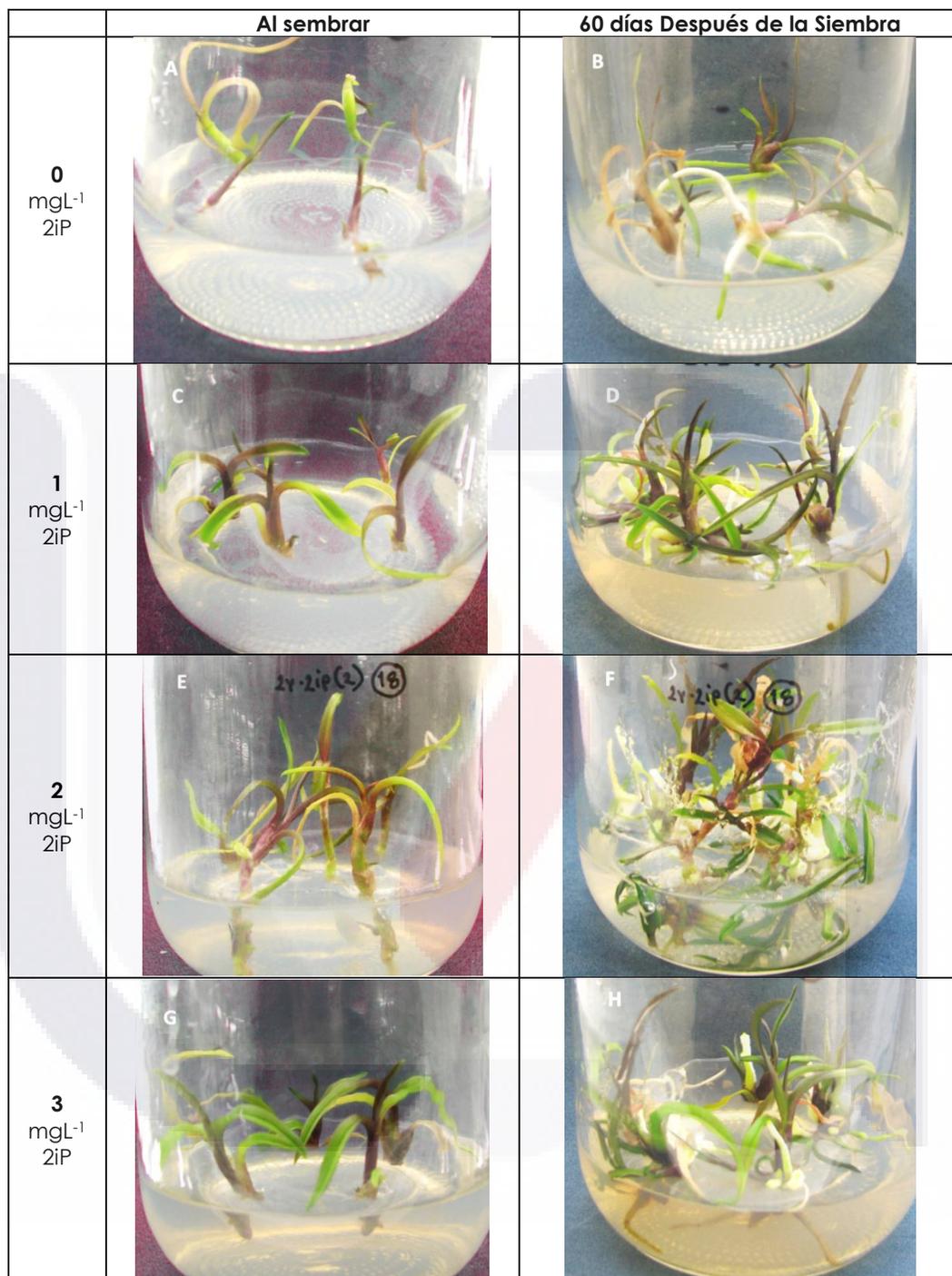
Medias Comparadas	Valor p
2iP1-2iP0	0.0039
2iP2-2iP0	0.0002
2iP3-2iP0	0.4047
2iP2-2iP1	0.6809
2iP3-2iP1	0.1331
2iP3-2iP2	0.0120

**Tabla 6.** Resultados del Test de Tukey aplicado a los datos obtenidos ante diferentes concentraciones de 2iP. Muestra el resultado del Test de Tukey; se encuentran sombreadas las medias que son significativamente diferentes entre sí.

El la Figura 11 se observan las fotografías de los explantes sometidos a tratamiento con 2iP a diferentes concentraciones a través del tiempo, se compara un explante consigo mismo al momento de la siembra y 60 días después.

En la Figura 11A se observan los explantes tras la colocación en el medio MS. Figura 11B, los mismos Explantes que en la fotografía previa, 60 días después de su siembra en el medio MS sin 2iP. Figura 11C, explantes tras la siembra en medio MS más  $1\text{mgL}^{-1}$  de 2iP. Figura 11D, los mismos explantes que en la fotografía previa, 60 días después de la siembra en medio MS con  $1\text{mgL}^{-1}$  de 2iP. Figura 11E, explantes tras la siembra en medio MS más  $2\text{mgL}^{-1}$  de 2iP. Figura 11F, los mismos explantes que en la fotografía previa, 60 días después de la siembra en medio MS con  $2\text{mgL}^{-1}$  de 2iP. Figura 11G, explantes tras la siembra en medio MS más  $3\text{mgL}^{-1}$  de 2iP. Figura 11H, los mismos explantes que en la fotografía previa, 60 días después de la siembra en medio MS con  $3\text{mgL}^{-1}$  de 2iP.

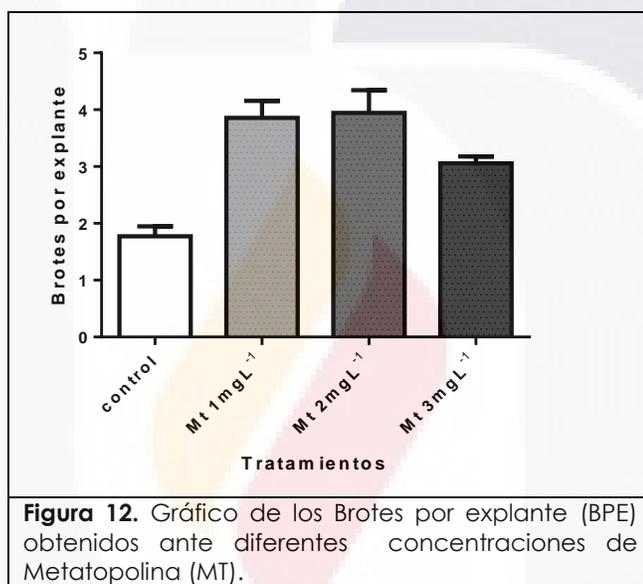
Con excepción de la cantidad de BPE, las plantas se mostraban similares en lo demás (crecimiento, formación de raíces, etc.), pero ciertamente mostró mayor tolerancia al medio de cultivo, pues mostró menor cantidad de necrosis de explantes que lo que se obtuvo en los tratamientos con BA.



**Figura 11.** Comparación de respuesta de los explantes ante diferentes tratamientos de Isopentiladenina. Fotografías de la respuesta al tratamiento con diferentes concentraciones de 2iP en el medio.

Respuesta a diferentes concentraciones de Mt en el medio:

En la Figura 12 se observa el gráfico de las medias para el tratamiento con MT a diferentes concentraciones y el control. Así, se detectó un incremento en la cantidad de BPE, ante el aumento en la concentración de MT, hasta una concentración de  $2\text{mgL}^{-1}$ , pero al igual que con 2iP, hay una disminución de los BPE cuando se alcanza una concentración en el medio de  $3\text{mgL}^{-1}$  de MT.



En la tabla 7, se muestra el concentrado de los datos obtenidos de las respuestas de los explantes para el control y las diferentes concentraciones de MT en el medio de cultivo, como el total de brotes sin necrosis, de los 35 sometidos a cada tratamiento (5 explantes por frasco, 7 frascos por tratamiento), además del conteo de Brotos Totales, tras 60 días de exposición; al final los Brotos por Explante (BPE) se obtienen de la división de los Brotos Totales, entre los Explantes sin necrosis de cada tratamiento. Se encontró una media de 1.771 BPE para el control; de 3.857 BPE para  $\text{MS}+1\text{mgL}^{-1}$  de MT; de 3.943 para  $\text{MS}+2\text{mgL}^{-1}$  de MT; y de 3.057 BPE para  $\text{MS}+3\text{mgL}^{-1}$  de MT tras 60 días de su siembra en el medio de cultivo.

Tratamiento	Explantos Sin Necrosis por frasco	Brotos Totales por frasco	BPE	BPE Media ± EE
0 mgL <sup>-1</sup> MT	5	12	2.4	1.771 ± 0.1769
	5	8	1.6	
	5	6	1.2	
	5	12	2.4	
	5	7	1.4	
	5	9	1.8	
	5	8	1.6	
1 mgL <sup>-1</sup> MT	5	13	2.6	3.857 ± 0.2983
	5	17	3.4	
	5	19	3.8	
	5	26	5.2	
	5	21	4.2	
	5	20	4	
	5	19	3.8	
2 mgL <sup>-1</sup> MT	5	15	3	3.943 ± 0.3993
	5	16	3.2	
	5	14	2.8	
	5	28	5.6	
	5	25	5	
	5	19	3.8	
	5	21	4.2	
3 mgL <sup>-1</sup> MT	5	16	3.2	3.057 ± 0.1212
	5	12	2.4	
	5	16	3.2	
	5	15	3	
	5	17	3.4	
	5	15	3	
	5	16	3.2	

**Tabla 7.** Datos obtenidos del experimento con Metatopolina (MT) a diferentes concentraciones en el medio de cultivo.

Tras realizar el análisis estadístico de ANOVA (Tabla 8), se encuentra evidencia suficiente para afirmar que hay diferencia significativa entre las medias obtenidas de BPE para las diferentes concentraciones de MT en el medio de cultivo ( $p < 0.0001$ ).

	Df	SS	MS	F	P
Tratamiento	3	21.26	7.088	13.76	P<0.0001
Residual	24	12.37	0.5152		
	27	33.63			

**Tabla 8.** Resultados de la prueba de ANOVA aplicada a los datos obtenidos ante el tratamiento con diferentes concentraciones de MT en el medio de cultivo.

Y tras realizar el Test de Tukey, en la Tabla 9 se observan las medias con diferencia significativa en celdas sombreadas, y a pesar de que en la Figura 10

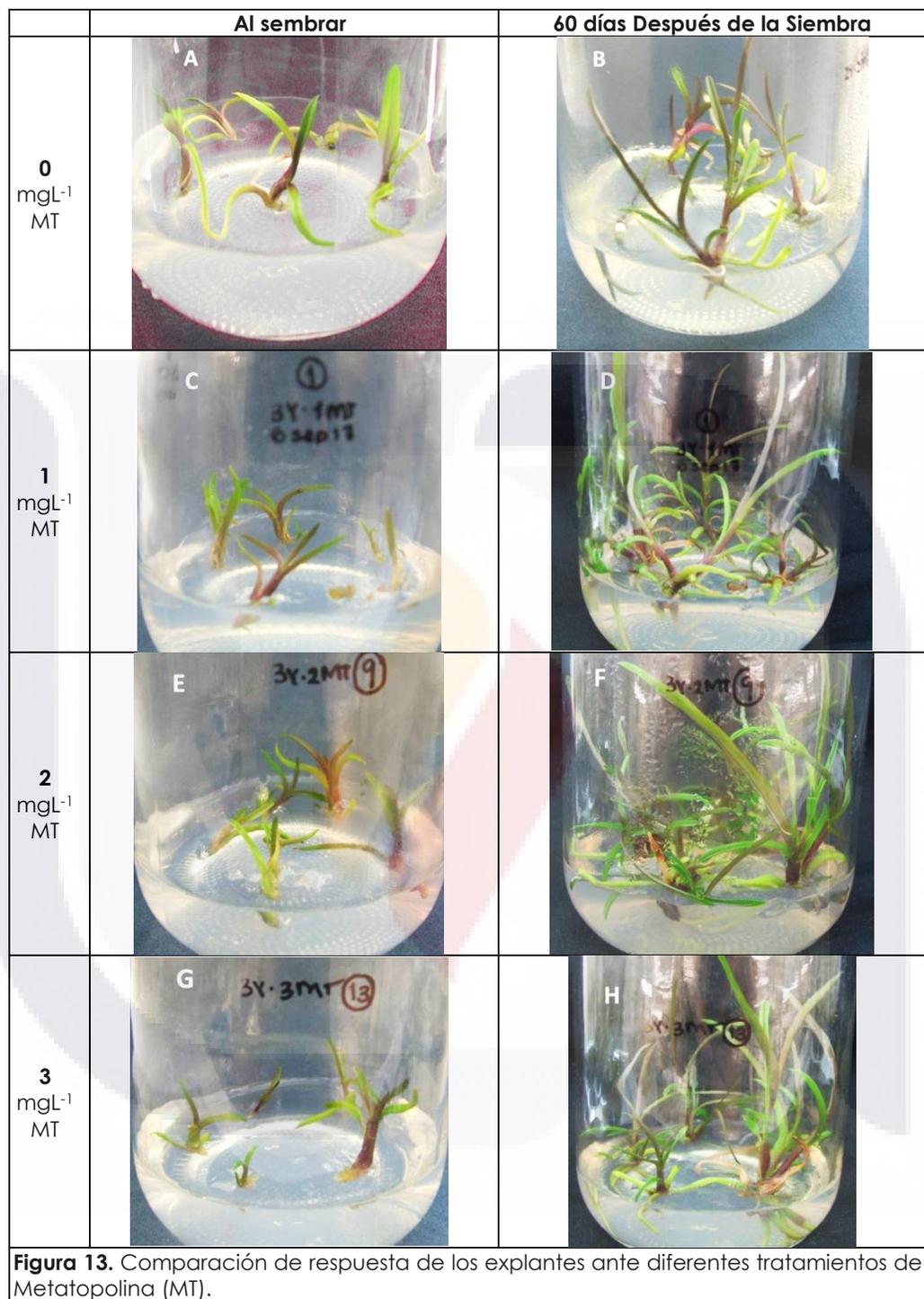
se observa un descenso en los BPE obtenidos para 3 mgL<sup>-1</sup> (3.03 BPE) no es significativamente diferente del de 2 mgL<sup>-1</sup> (3.90 BPE), ni ésta de la de 1 mg L<sup>-1</sup> MT (3.857 BPE), y las 3 medias son diferentes del control. Por lo tanto se puede afirmar que la dosis mínima efectiva, con la que se obtiene el mayor número de brotes por explante es de 1mgL<sup>-1</sup> de MT.

Medias Comparadas	Valor p
MT1-MT0	0.0000
MT2-MT0	0.0000
MT3-MT0	0.0108
MT2-MT1	0.9964
MT3-MT1	0.2137
MT3-MT2	0.1462

**Tabla 9.** Resultados del Test de Tukey aplicado a los datos obtenidos ante diferentes concentraciones de MT. Muestra el resultado del Test de Tukey; se encuentran sombreadas las medias que son significativamente diferentes entre sí.

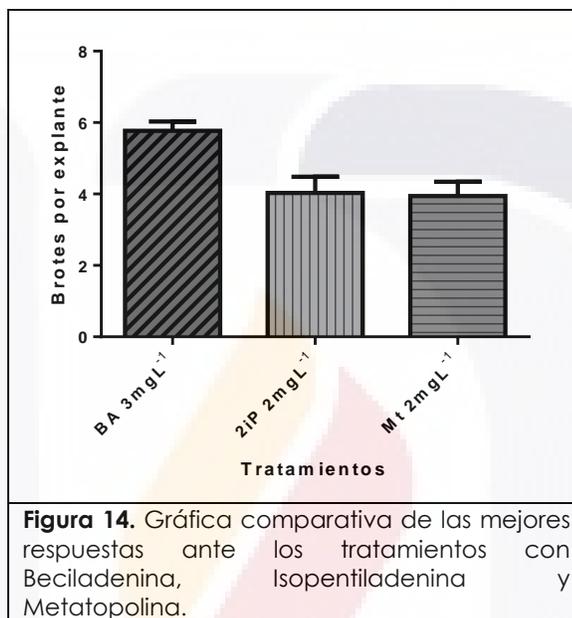
En la Figura 14 se pueden observar las fotografías de la respuesta al tratamiento con diferentes concentraciones de MT en el medio. Figura 14 A, explantes tras la colocación en el medio MS. Figura 14B, Los mismos explantes que en la fotografía previa, 60 días después de su siembra en el medio MS sin MT. Figura 14C, explantes tras la siembra en medio MS más 1mgL<sup>-1</sup> de MT. Figura 14 D, los mismos explantes que en la fotografía previa, 60 días después de la siembra en medio MS con 1mgL<sup>-1</sup> de MT. Figura 14E, explantes tras la siembra en medio MS más 2mgL<sup>-1</sup> de MT. Figura 14F, los mismos explantes que en la fotografía previa, 60 días después de la siembra en medio MS con 2mgL<sup>-1</sup> de MT. Figura 14G, explantes tras la siembra en medio MS más 3mgL<sup>-1</sup> de MT. Figura 14H, los mismos explantes que en la fotografía previa, 60 días después de la siembra en medio MS con 3mgL<sup>-1</sup> de MT.

Nótese la diferencia de los explantes al momento de la colocación en el medio adicionado con MT a diferentes concentraciones (Figura 14A, 14C, 14E y 14G) y contrastar la diferencia 60 días después (Figura 14B, 14D, 14F y 14H). En general se aprecia el desarrollo y crecimiento de los explantes de forma similar ante todas las concentraciones de MT en el medio, además que todos los explantes desarrollaron raíces y se mostraron vigorosos.



Comparación entre Respuestas a los Reguladores adicionados al medio para multiplicación por Yemas Axilares.

Se comparó la mejor respuesta obtenida para cada una de las citocininas probadas, para observar si hay diferencia significativa entre las medias de los brotes por explante obtenidos (Figura 14).



Tras realizar el análisis estadístico de ANOVA, se encuentra evidencia suficiente para afirmar que hay diferencia significativa entre las medias de los BPE por tratamiento. Y al aplicar el Test de Tukey, se observa que los BPE obtenidos con 3mgL<sup>-1</sup> de BA son significativamente diferentes a los obtenidos con 2mgL<sup>-1</sup> de 2iP (p 0.0118) y 2mgL<sup>-1</sup> de Mt (p 0.0084), mientras que no se encuentran diferencias significativas entre los BPE obtenidos con 2mgL<sup>-1</sup> de 2iP y 2mgL<sup>-1</sup> de Mt (p 0.9861). Es decir que al comparar la eficiencia de las citocininas, el que genera mayor número de BPE es la BA a una concentración de 3mgL<sup>-1</sup>.

Se ha reportado también para otras orquídeas la ventaja que ofrece la Benciladenina en cuanto a la multiplicación a través de yemas axilares. Por ejemplo se obtuvieron 42 BPE en 132 días, para *Vanilla planifolia*, después de sembrar en medio semisólido MS adicionado 2mgL<sup>-1</sup>BA, después un subcultivo en

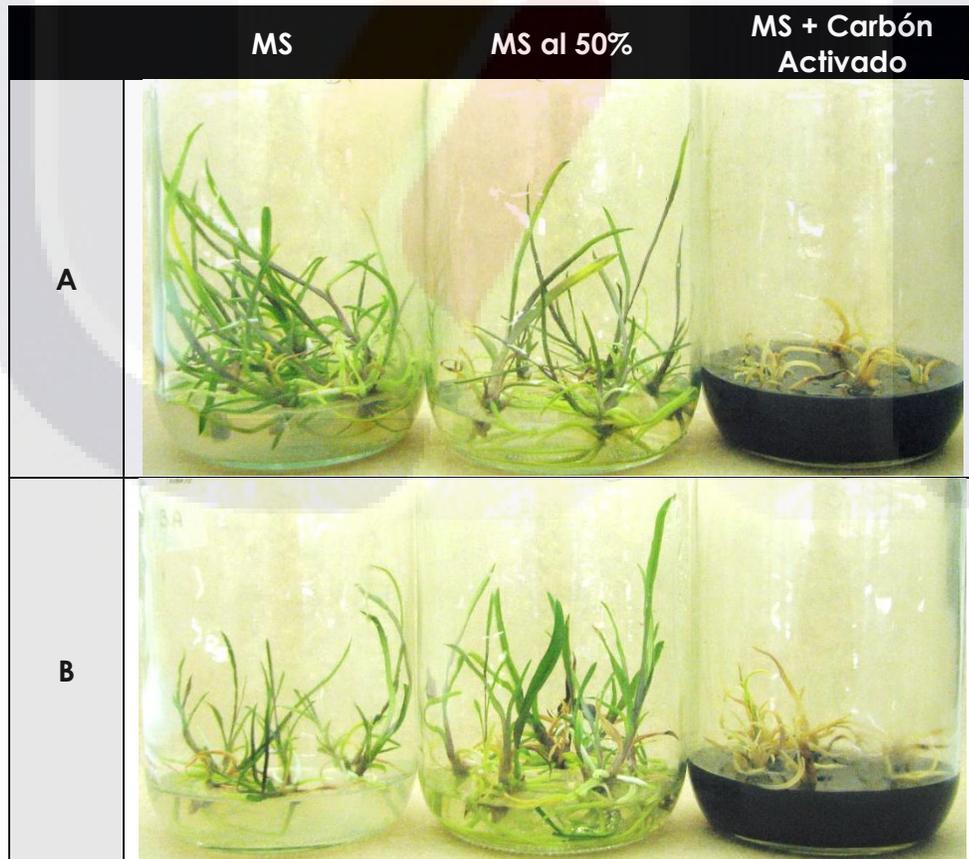
medio MS líquido, más  $2\text{mgL}^{-1}\text{BA}$  y  $1\text{mgL}^{-1}\text{ANA}$ , y un último subcultivo en medio MS semisólido adicionado con  $1\text{mgL}^{-1}\text{BA}$  y  $0.5\text{mgL}^{-1}\text{ANA}$ <sup>[50]</sup>; también en *V. planifolia* se obtiene 9.4 BPE tras 20 días después del cultivo de explantes en medio MS adicionado con  $1\text{mgL}^{-1}\text{BA}$  y agua de coco  $150\text{mL}^{-1}$  <sup>[51]</sup>. También para *Vanda spathulata*, se encuentra que la BA pero esta vez, en combinación con AIA, genera mayor cantidad de BPE<sup>[52]</sup>. Como en el presente estudio los periodos de cultivo fueron relativamente cortos y se pudo obtener una respuesta satisfactoria, además en este caso se pudo demostrar que no es necesario realizar un medio de cultivo con múltiples RCV u otros añadidos orgánicos para obtener una muy buena respuesta.



**Crecimiento y desarrollo de plántulas obtenidas *in vitro*.**

Comparación entre Respuestas a los Reguladores adicionados al medio para multiplicación por Yemas Axilares.

En la figura 15 se muestran fotografías comparativas entre las diferentes respuestas de los explantes ante 3 medios de cultivo diferentes con el fin de evaluar su crecimiento y desarrollo tras 90 días de su siembra. En la Figura 15A se observa una mayor altura y grosor de las plántulas en MS que en MS al 50%, mientras que en la Figura 15B la altura y talla mayores se aprecia en las plántulas de MS al 50%, y en la Figura 15C se observan de similar talla y grosor las plántulas expuestas al medio MS y MS al 50%. Mientras que todos los explantes sometidos al medio MS adicionado con carbón activado (CA) sufrieron necrosis.





**Figura 15.** Fotografías comparativas entre las respuestas de los explantes sometidos a diferentes medios de cultivo para Crecimiento y Desarrollo. Se muestran de izquierda a derecha los explantes sometidos a medio MS, MS al 50%, y MS+2g<sup>L</sup><sup>-1</sup> de Carbón Activado (CA), tras 90 días de su cultivo.

En la figura 16 se observan imágenes fotográficas que muestran la diferencia entre explantes privados de su extremo radical antes de su siembra en el medio MS + CA (Figura 16A) y los explantes a los que no se les priva de su extremo radical antes de su siembra en el mismo medio de cultivo.

Se encontró que los explantes a los que previamente se privó del extremo radical no puedan sobrevivir en un medio MS + CA, nos demuestra que éste no favorece su formación, pero aun así, explantes que no han sido privados previamente de sus raíces, y fueron colocados en este medio, no sufren ninguna consecuencia desfavorable, sino que muestran vitalidad y aumento de talla, continuando su crecimiento en este ambiente.

De modo que la interferencia en la formación de raíces es tan severa, que culmina con la muerte del explante observada en aquellos privados de su raíz, pero no interfiere en el proceso de crecimiento y desarrollo de explantes que si poseen raíz al momento de su siembra.



Para el análisis de los datos analizados para crecimiento y desarrollo no se pudo incluir nada relacionado al medio con CA, debido al problema anteriormente descrito, por lo que se lleva a cabo únicamente el análisis de los datos generados por los explantes sembrados en medio MS y MS50%.

En la Tabla 10 se encuentra el concentrado de los datos recabados al medir altura, diámetro y raíces por explante para cada uno de los medios sobrevivientes. Para las plántulas cultivadas en medio MS, se encontró una media de altura de 8.87 cm, una media de diámetro total de 14.39mm, una media de 10.15 raíces por explante y un peso total 66.33 gr. Para el medio MS50% se encuentra una media de altura de 7.15cm, de diámetro de 15.32 mm, 12.311 raíces por explante y 60.82 gr de peso total.

Tras realizar el T test, se encuentra evidencia de que la diferencia entre las medias de Altura es significativa (p 0.0039), mientras que tras realizar el mismo procedimiento con las medias de Diámetro (p 0.590) se encuentra que no son diferentes entre sí, y tampoco lo son las medias de Raíces por explante (p 0.127). En cuanto a la diferencia de pesos, las plántulas obtenidas en el medio MS al 50% pesan 5.51gr menos que las obtenidas en medio MS.

Se encuentra que la media de Diámetro para MS es de 14.39mm, y para MS50% de 15.32, además de la formación incipiente de pseudobulbos, lo que podría estar relacionado a la capacidad de las orquídeas de adaptarse a ambientes pobres en nutrientes, y estimular la acumulación de nutrientes en el medio MS50%, mientras que esta habilidad no se ve tan estimulada en un ambiente más rico en nutrientes (MS).

La media de Altura para MS es de 8.87mm. y de 7.15mm. para MS50%, la altura se obtuvo al medir la longitud de la hoja más larga. Y se encontró que si hay evidencia estadística de diferencia entre las medias, resultando en una mayor altura las plántulas sembradas en medio MS, jugando un papel importante los nutrientes en el medio para el desarrollo de la plántula.

En cuanto al número de raíces por explante, se encuentra que hay una mayor densidad en las plántulas sembradas en medio MS50%, lo cual es muy sugerente, pues al estar en un medio empobrecido, la respuesta de la plántula es generar un mayor número de raíces para poder obtener la mayor cantidad posible de nutrientes.

En cuanto al peso obtenido para cada uno de los tratamientos, podría deberse a que a pesar de que en MS50% las plántulas tienden a acumular un poco más en su pseudobulbo, en un medio más rico en nutrientes, la planta invierte en el desarrollo foliar y generación de biomasa, lo cual es compatible con lo encontrado en cuanto a la diferencia de la Altura de las plántulas, pues al encontrarse en un ambiente más favorable el crecimiento es una consecuencia natural.

MS			MS al 50%				
Diámetro (mm)	Altura (cm)	Núm. de Raíces	Peso (gr)	Diámetro (mm)	Altura (cm)	Núm. de Raíces	Peso (gr)
16.6	9.5	10	66.33	10.5	9.3	8	60.82
4.9	5	4		11.5	4.7	9	
15.6	10.4	12		8	8	8	
14.5	6.2	14		14.2	5.5	11	
18.5	10.4	12		9.2	5.4	5	

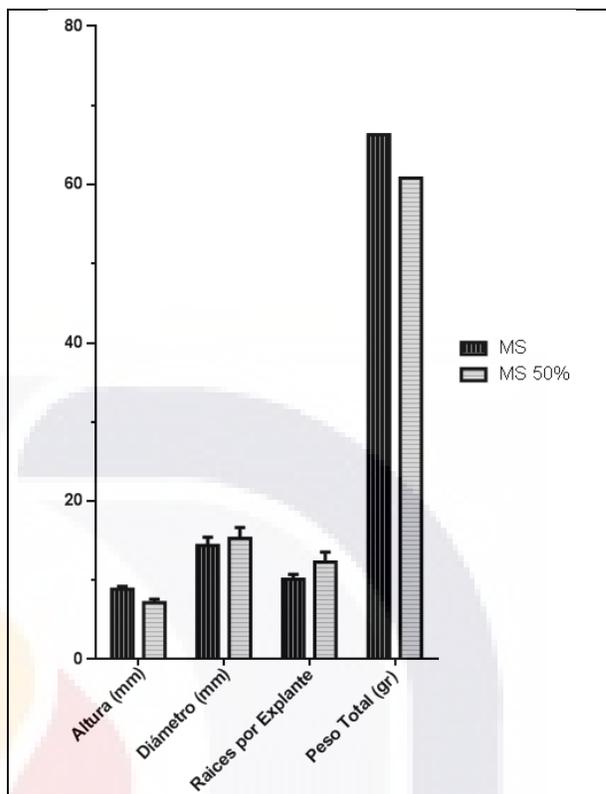
12.7	10.5	10		12.6	8	9	
10.6	11.6	7		4	13.4	4	
11.1	10	9		6.7	2	3	
17.3	10	11		10	4.7	3	
4.7	12	5		9.1	8.3	5	
4	13.6	3		6.1	8.5	4	
14.2	10.7	8		15.9	4.3	13	
21.8	12.4	13		6.4	6.2	8	
6.4	9.4	5		6	7.7	10	
12.8	13.3	10		7.4	12.1	6	
23.5	10	15		11.7	8	10	
6.2	7.2	7		30.3	10.2	25	
20.8	11.3	17		20.5	12.8	16	
12.2	12.5	6		6	4.2	2	
18.7	8.9	15		9	4	6	
6.3	8.6	6		13.7	7.9	14	
13.2	9.2	11		15.1	11	13	
15.4	11.4	14		12.8	8.6	16	
9.2	10.2	7		8	12.3	7	
14.8	6	11		21.1	4.5	8	
23	5.7	18		21.1	4.8	8	
15.9	2.8	8		23.6	12.8	13	
26.5	7.2	16		12.6	9	14	
21.8	6.7	10		10.9	6	8	
17.1	6.4	18		8.1	8.4	8	
15.3	12.2	9		5.2	5.8	6	
31.8	8.8	13		12.8	6.6	10	
12.5	8.7	9		14.3	12.4	15	
17.5	11	9		14	11.3	10	
37.3	10.2	14		11.3	6.5	8	
20.1	8.3	12		13.8	9.3	12	
8.8	5.5	9		16.5	3.2	18	
12.1	8.7	14		13.6	3.5	13	
3.9	4	5		16.5	2.7	14	
8	11	6		22.8	3.4	19	
4.4	9.2	3		45.9	4.3	42	
7.9	10.5	8		50.5	3.9	50	
9.8	7.5	12		20.6	6.5	16	
10.4	8	7		28.9	6.5	19	
12.8	5	8		24.7	4.7	14	
7.5	4.8	10		24.8	5.5	21	
19	3.3	6		15.6	6.5	10	
21.5	9.8	21		21.4	8	20	
$\mu \pm EE$	$\mu \pm EE$	$\mu \pm EE$		$\mu \pm EE$	$\mu \pm EE$	$\mu \pm EE$	
14.39 ± 1.04	8.87 ± 0.385	10.15 ± 0.60		15.32 ± 1.36	7.15 ± 0.435	12.31 ± 1.27	

**Tabla 10.** Crecimiento y Desarrollo. Contraste de datos obtenidos de los 2 medios de cultivo que generaron crecimiento (M S y MS al 50%). Se tomaron en cuenta datos cuantitativos, como diámetro total (derivado de la suma del diámetro de todos los brotes por explante), longitud de la hoja más larga y raíces generadas por explante.

En la figura 17 podemos apreciar una Gráfica de columnas, derivadas de los datos previamente manifestados en la tabla 10 obtenidos de las respuestas de los explantes cultivados en medio MS y MS50% para crecimiento y desarrollo. Se aprecia claramente que las respuestas son muy similares en cuanto a Diámetro, Raíces por explante y Peso total; y se observa la diferencia entre la respuesta de crecimiento.

Se encuentra reportado en la literatura el uso combinado de  $0.1\text{mg L}^{-1}$  de ANA y  $0.5\text{mgL}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$ , para obtención en 4 meses de plántulas de 3 a 5 cm de altura, aptas para su aclimatación [16], en otro estudio, también se reporta el empleo de un medio MS adicionado con ANA y  $\text{GA}_3$  para el crecimiento de plántulas obtenidas de protocormos [18].

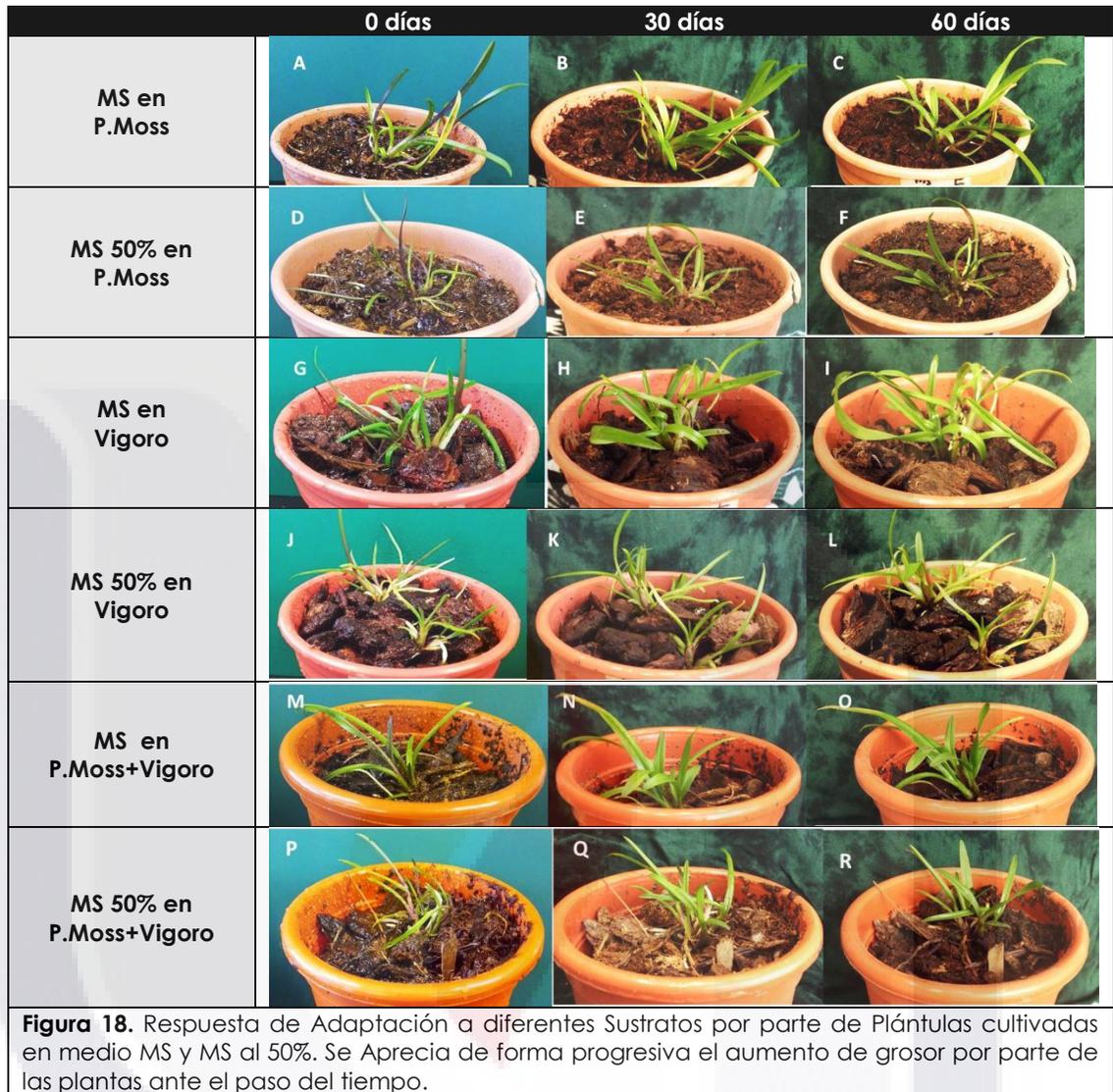
En el presente estudio se obtuvieron plántulas aptas para su aclimatación con una altura media de entre 7 y 9 cm, en 90 días, procedentes de explantes de entre 2 y 3 cm, en medio MS o MS50%, si ser necesaria la adición de algún RCV agregado al medio de cultivo.



**Figura 17.** Grafica Comparativa de Resultados para Crecimiento y desarrollo entre MS y MS 50%.

## **Aclimatación.**

En la Figura 18 se muestran fotografías de las plantas aclimatadas a través del tiempo para observar sus respuestas. En la Figura 18A, se observa planta de *L. speciosa* procedente de medio MS, al momento de su colocación en Peat Moss. Figura 18B, se observa la misma planta, tras 30 días de colocación en el sustrato. Figura 18C, se observa la misma planta tras permanecer 60 días después de su colocación en el sustrato, ya tras 40 días en invernadero. Figura 18D, se observa planta de *L. speciosa* procedente de medio MS al 50%, al momento de su colocación en Peat Moss. Figura 18E, se observa la misma planta, tras 30 días de colocación en el sustrato. Figura 18F, se observa la misma planta tras permanecer 60 días después de su colocación en el sustrato, ya tras 40 días en invernadero. Figura 18G, se observa planta de *L. speciosa* procedente de medio MS, al momento de su colocación en Sustrato Vigoro. H, se observa la misma planta, tras 30 días de colocación en el sustrato. Figura 18I, se observa la misma planta tras permanecer 60 días después de su colocación en el sustrato, ya tras 40 días en invernadero. Figura 18J, se observa planta de *L. speciosa* procedente de medio MS al 50%, al momento de su colocación en Sustrato Vigoro. Figura 18K, se observa la misma planta, tras 30 días de colocación en el sustrato. Figura 18L, se observa la misma planta tras permanecer 60 días después de su colocación en el sustrato, ya tras 40 días en invernadero. Figura 18M, se observa planta de *L. speciosa* procedente de medio MS, al momento de su colocación en mezcla de Peat Moss y Sustrato Vigoro. Figura 18N, se observa la misma planta, tras 30 días de colocación en el sustrato. Figura 18O, se observa la misma planta tras permanecer 60 días después de su colocación en el sustrato, ya tras 40 días en invernadero. Figura 18P, se observa planta de *L. speciosa* procedente de medio MS al 50%, al momento de su colocación en mezcla de Peat Moss y Sustrato Vigoro. Q, se observa la misma planta, tras 30 días de colocación en el sustrato. R, se observa la misma planta tras permanecer 60 días después de su colocación en el sustrato, ya tras 40 días en invernadero.



Tras la colocación de plantas en los 3 diferentes sustratos (Figura 18), no se encontró alguna diferencia importante en lo referente al vigor de la planta, en todos los sustratos se observó aumento de talla y grosor (Figuras 18A, en comparación con 18B y 18C, y figura 18D, en comparación con 18E y 18F, etc.), además de la formación de hojas nuevas. Sin embargo es destacable, que mantener el peat moss hidratado es más fácil que el sustrato comercial, que requiere una mayor cantidad y frecuencia de regado, pues debido a su conformación (fragmentos de corteza, principalmente) retiene menos la humedad. Solamente se ha presentado la pérdida de una sola de las plantas que

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

presentó necrosis, perteneciente al grupo de MS al 50% colocada en Peat Moss+Vigoro. Se encontró sobrevivencia del 98.3% de las 60 plantas aclimatadas, tras 60 días *ex vitro*. No se utilizó ningún tratamiento fungicida ni se hizo uso de algún fertilizante.

La diferencia de plántulas sobrevivientes no es significativa, por lo que se encuentra una tolerancia similar entre las plántulas de MS y MS 50% ante los diferentes sustratos probados.

En cuanto a la aclimatación de *Laelia speciosa*, previamente se había observado una supervivencia de aproximadamente el 70% de las plántulas aclimatadas<sup>[18]</sup>, en donde se inicia la aclimatación en plantas regeneradas *in vitro* d 3 cm de altura. Pero, es de notar que existe una relación entre el tamaño de la plántula y la capacidad de aclimatación, pues se ha reportado en la literatura que mientras plántulas de 5 cm de altura presentaban un rango de supervivencia del 77%, aquellas que apenas oscilaban entre 1 y 2 cm de altura presentaron un 0% de supervivencia<sup>[39]</sup>. Además posteriormente fue documentado que un periodo de pre-adaptación a las condiciones *ex vitro*, favorecía de manera significativa la sobrevivencia en condiciones más adversas, es decir, que se mantuviera a las plantas un periodo de 20 días, tras ser colocadas en sustrato, protegidas por una ambiente cerrado con mayor humedad (cámaras de aclimatación dadas por bolsas plásticas) durante 20 días, que fueron abriéndose paulatinamente cada 2 días, y obteniéndose una sobrevivencia de entre 97-100 % de las plántulas aclimatadas<sup>[19]</sup>, lo cual favorecía la adaptación de la apertura de los estomas, y mitiga la pérdida de agua. Por lo tanto se sugiere que debido a estos dos importantes factores (plántulas de al menos 5 cm de altura y periodo de pre-aclimatación) se pudo obtener una alta tasa de supervivencia de las plantas aclimatadas en el presente estudio.

## CONCLUSIONES

- ❖ Se logró cultivar, mantener, propagar *in vitro* y aclimatar a la orquídea *Laelia speciosa* (orchidaceae) a partir de material vegetal nativo del Estado de Aguascalientes.
- ❖ Se logró germinar de manera asimbiótica semillas de *Laelia speciosa* exitosamente, en medio MS, obteniendo protocormos y posteriormente plántulas.
- ❖ Se diseñó un protocolo para la multiplicación *in vitro* de protocormos (Anexo A)
- ❖ Se determinó que el medio que proporciona las condiciones óptimas para la conversión de protocormos en plántulas es el medio MS sin la necesidad de adicionar algún RCV, en donde puede permanecer hasta 2 o 3 meses, con un Subcultivo posterior para continuar con el crecimiento y desarrollo de la plántula.
- ❖ Se encontró que la capacidad de multiplicación de los PLB's es mucho mayor que la de los protocormos.
- ❖ El medio que proporciona las condiciones óptimas para la conversión de PLB's a plántula es también el medio MS, sin RCV añadido, en donde puede permanecer hasta 2 meses, siendo necesario un Subcultivo posterior para que se continúe el crecimiento y desarrollo de la plántula.
- ❖ Se encontró que la multiplicación de los PLB's es muy similar utilizando  $1\text{ mgL}^{-1}$  de BA y  $1\text{ mgL}^{-1}$  de 2iP, y en ambos casos muy efectiva.
- ❖ Se comprobó que la BA en una concentración de  $3\text{ mgL}^{-1}$  es con lo que se obtiene una mayor tasa, estadísticamente significativa, de brotes adventicios en la multiplicación *in vitro* a partir de yemas axilares.
- ❖ Se desarrolló un protocolo para la multiplicación *in vitro* de plantas de *Laelia speciosa* a partir de yemas axilares (Anexo B).
- ❖ En cuanto al crecimiento y desarrollo, se observó que la única diferencia significativa entre el medio MS y el medio MS50% fue la altura de las plántulas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cultivadas en el primero; sin embargo, en cuanto a las demás características (diámetro, cantidad de raíces y peso) no se encuentra diferencia estadísticamente significativa.

- ❖ Por lo anterior se encontró útil el empleo de MS50% pues con menor uso de recursos se obtiene una buena respuesta por parte de las plántulas.
- ❖ Se encuentra que el medio MS adicionado con Carbón activado en una concentración de  $2\text{gL}^{-1}$  inhibe de forma drástica el desarrollo de raíces en explantes a los que se retira la raíz antes de su siembra.
- ❖ Se determina que los 20 días en la cámara de incubación de ambiente controlado ayudan a la adaptación de las plántulas a su aclimatación y transferencia a las condiciones de vida *ex vitro*, pues se encuentra una supervivencia del 98.3% del total de las plantas.
- ❖ Se encontró ventaja en el uso de Peat moss, ya sea sólo o en combinación 1:1 con sustrato a base de corteza, debido a la capacidad de mantener más la humedad, y por ende requerir menos frecuencia y cantidad de agua para su riego.

## GLOSARIO

**Aclimatación:** Es el proceso mediante el cual se adapta de forma gradual a una planta de condiciones controladas *in vitro* a las condiciones adversas *ex vitro*, con

**Embriogénesis Somática:** Es el desarrollo de embriones a partir de células que no provienen de la fusión gamética, es decir, que se genera un embrión a partir de una célula somática.

**Explante:** En el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, es prácticamente cualquier estructura vegetal (embriones, semillas, retoños, inflorescencias, tallos, raíces, meristemos, células en suspensión, protoplastos, anteras, granos de polen, etc.) colocados en un medio de cultivo químicamente definido y bajo condiciones ambientales controladas.

**Germinación asimbiótica:** Es aquella que se da en condiciones estériles en un ambiente nutritivo.

**Germinación simbiótica:** Es la que ocurre en presencia de un hongo micorrízico, que brinda a la semilla de orquídea los nutrientes necesarios para su desarrollo.

**Plasticidad\*\*:** Es la característica que marca la diferencia entre las células animales y vegetales en su capacidad de multiplicación, la división, la diferenciación y la formación de un nuevo individuo

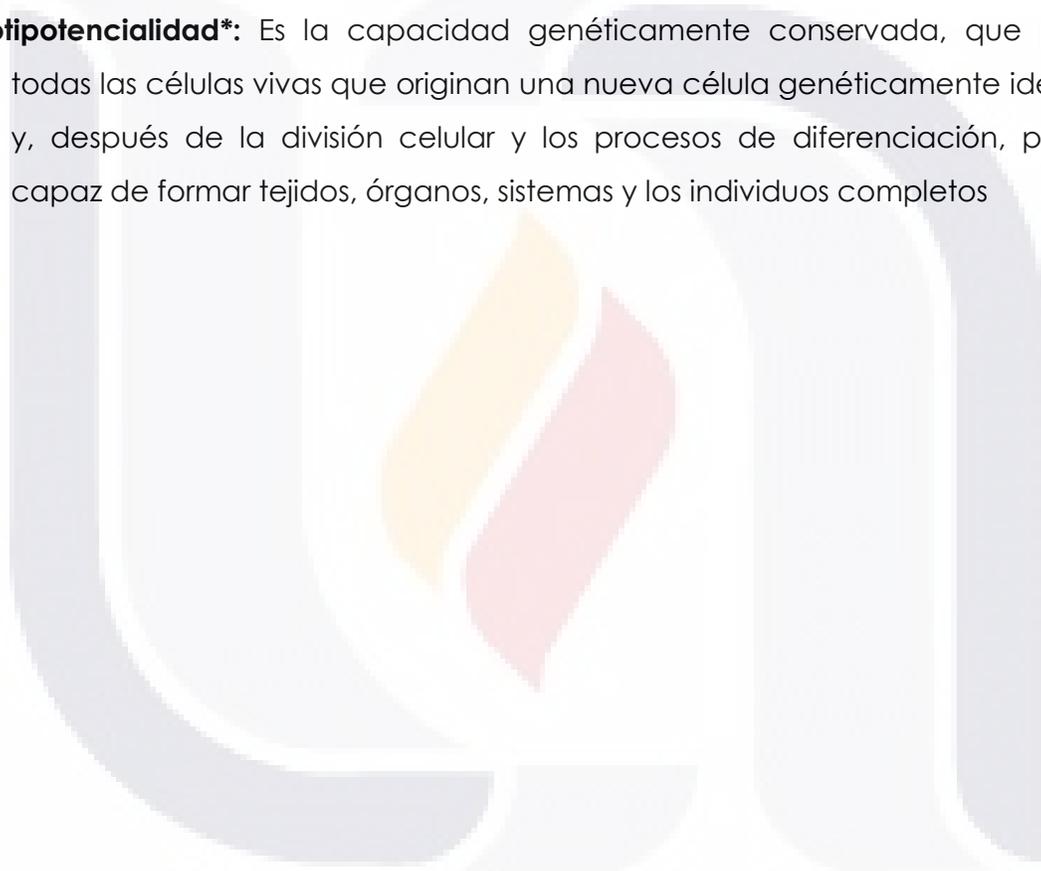
**Protocormos:** Es una estructura esférica formada por una masa indiferenciada de células, resultante de la germinación de un embrión de orquídea.

**Protoplastos** (vegetal): Célula a la que se ha eliminado mecánica o enzimáticamente su pared celular, rodeada por su membrana plasmática, potencialmente capaz de regenerar su pared celular, crecer y dividirse.

**Reguladores de Crecimiento Vegetal:** Son moléculas orgánicas que afectan en muy pequeñas concentraciones, de manera profunda los procesos de la

planta, tales como, el crecimiento, la organogénesis, etc. Aquellas que se encuentran de forma natural en la planta se denominan fitohormonas, y las obtenidas de forma sintética suelen ser más resistentes a la degradación enzimática y por lo tanto tienen una efectividad más alta. Se conocen varios tipos: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, poliaminas, jazmonatos, ácido salicílico y brasinoesteroides (las dos primeras, son las que mayor uso tienen en la micropropagación).

**Totipotencialidad\*:** Es la capacidad genéticamente conservada, que poseen todas las células vivas que originan una nueva célula genéticamente idénticos, y, después de la división celular y los procesos de diferenciación, para ser capaz de formar tejidos, órganos, sistemas y los individuos completos



## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Torres, D. 2006. Los rituales funerarios como estrategias simbólicas que regulan las relaciones entre las personas y las culturas. *Sapiens* 7(2): 107-118.
- [2] Wing Y., T. y J. Arditti. 2009. History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. *Plant Biotechnol Rep* 3:1-56.
- [3] Ossenbach, C. 2005. History of orchids in Central America part I: from Prehispanic times to the Independence of the New Republics. *Harvard Papers in Botany* 10(2):183-226.
- [4] Hágsater, E., M. Á. Soto A., G.A. Salazar Ch., R. Jiménez M., M.A. López R. y R.L. Dresler. 2005. Orquídeas y Gente. En *Las Orquídeas de México*. Instituto Chinoín, México. pp: 38-71.
- [5] Ospina, M. 1997. Orchids and the Aztecs. *Orchids* 66:1160-1162.
- [6] Micheneau, C., S. D. Johnson y M. F. Fay. 2009. Orchid pollination: from Darwin to the present day. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 1-19.
- [7] Flores P., A. y A. Brewster. 2002. *Introducción al cultivo de orquídeas*. Instituto de Ecología A.C. Asociación Mexicana de Orquideología. Xalapa. 240 p.
- [8] Flores P., A. y S. Valencia D. 2007. "Local illegal trade reveals unknown diversity and involves a high species richness of wild vascular epiphytes". *Biological Conservation*. 136: 372 -387.
- [9] Naranjo, E. J., R. Dirzo, J. López, J. Rendon V. O., A. Reuter y N. Sosa-Nishizaki. 2009. Impacto de los factores antropogénicos de afectación directa a las poblaciones silvestres de flora y fauna, en *Capital natural de México: Estado de conservación y tendencias de cambio*. Conabio. pp: 247-276.
- [10] Téllez V., M. A. A. 2011. Análisis del diagnóstico de la familia Orchidaceae en México. Universidad Autónoma de Chapingo. pp: 21-22

- [11] Hágsater, E., M. Á. Soto A., G.A. Salazar Ch., R. Jiménez M., M.A. López R. y R.L. Dresler. 2005. Conservación. En *Las Orquídeas de México*. Instituto Chinoín, México. pp: 276-284.
- [12] Macías F., M.C., M. de la Cerda L. y M. A. A. Téllez V. 2005. La Familia *Orchidaceae* en el Estado de Aguascalientes. *Scientiae Naturae* 7(2):21-68.
- [13] Hágsater, E., M. Á. Soto A., G.A. Salazar Ch., R. Jiménez M., M.A. López R. y R.L. Dresler. 2005. Historia Natural. En *Las Orquídeas de México*. Instituto Chinoín, México. pp: 13-37.
- [14] Halbinger, F. y M. Soto. 1997. *Laelias* of Mexico. *Orquídea (Méx.)* Herbario AMO. Mexico city. pp 13–14, 17, 135-144.
- [15] Alberico, L. 2004. Germinación *in vitro* de semillas de *Laelia speciosa*, orquídea en peligro de Extinción. Universidad Autónoma Metropolitana. Tesis.
- [16] Ávila D., I. y R. Salgado G. 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Biológicas* 8: 138-149
- [17] Ávila D., I. y K. Oyama. 2007. Conservation Genetics of an endemic and epiphytic *Laelia speciosa* (*Orchidaceae*). *American Journal of Botany* 94(2):184-193.
- [18] Sarabia O., M.E., I. Avila D., A. Carlos G. y R. Salgado G. 2010. Callus growth and plant regeneration in *Laelia speciosa* (*Orchidaceae*). *Lankesteriana* 10(1): 13-18.
- [19] Ortega L., M.M., R. Salgado G., C. Gómez A. e I. Ávila D. 2011. Acclimatization of the endangered Mexican epiphytic orchid, *Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr. *European Journal of Environmental Sciences* 1(2): 48–54.
- [20] Pérez M. B., E.M., R. Ramírez M., H.G. Nuñez P. y N. Ochoa A. 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. pp: 9-10.

- [21] García G., R., K. Quiroz, B. Carrasco y P. Caligari. 2010. Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges Cien. Inv.Agr. 37(3):5-30.
- [22] Lee E., H., A. Laguna C., J. Murguía G., L. Iglesias A., B. García R., D. Escobedo L., Y. M. Martínez O., F. A. Barredo P. y N. Santana B. 2010. Un protocolo de embriogénesis somática para la regeneración y caracterización *in vitro* de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*. Rev. fitotec. Mex. 33(4):323-332
- [23] Chen, J. T., C. Chang y W. C. Chang. 1999. Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* Gower Ramsey and subsequent plant regeneration. Plant Cell Reports 19: 143-149.
- [24] Kerbauy, G. B. 1994. (*Orchidaceae*) by means of root tip culture. Plant Cell Reports 3; 27-29.
- [25] Tupac, O., J. Ospina y Paul Bayman. 2009. Symbiotic vs. asymbiotic seed germination in epiphytic orchids Acta Agron. 58(4):270-276
- [26] Álvarez P., V., M. Ferreira, A. Gui y V. Nunes. 2006. Seed disinfection methods for *in vitro* cultivation of epiphyte orchids from Southern. Brazil.Hortic. Bras. 24(2):217-220
- [27] Shrestha, B.R., K. Tokuhara y M. Mii. 2007. Plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Phalaenopsis*. Plant Cell Rep 26(7):19-25
- [28] Le Van T., H., T. Takamurab y M. Tanaka. 2004. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid . Plant Science 166:1443-1449
- [29] Tan, A.M., M. Danial, M. Maziah y S. Sreeramanan. 2012. Exquisite protocol of callus induction and protocorm-like bodies (PLBs) regeneration of *Dendrobium sonia*-28. AJCS 6(5):793-800.
- [30] George, P.S y G. A. Ravishankar 1997. *In vitro* multiplication of *Vanilla planifolia* using axillary bud explants. Plant Cell Reports 16:490-494

- [31] Flores E., G., I. Gil V., M.T. Colinas L., M. Mata R. 2011. *In vitro* propagation of *Brassia verrucosa* (Bateman ex Lindl.) orchid Rev. Chapingo Ser.Hortic 17(1):5-8.
- [32] Ruiz, B.C. 2008. Germinación *in vitro* de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae). Phytion 77: 203-215.
- [33] Flores E., G., I. Gil V., J. P. Legaria S. y M. T. Colinas L. 2008. Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. Una orquídea amenazada y endémica de México. Revista Chapingo Serie Horticultura 14(3): 347-353
- [34] Raya M., Y.A., G. Carrillo C., M. E. Pedraza S., T. Corona T., J. A. Carrillo S. y G. Alcantar G. 2011. *In vitro* propagation of *Laelia halbingeriana*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Pub Esp. 3:539-553
- [35] Coello, C. Y. 2010. Plant growth regulators optimization for *in vitro* cultivation of the orchid *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressier & W.E.Higgins. Gayana Bot. 67(1):19-26
- [36] Lee E, H., J. Murguía G., A. Laguna C., B. García R., M. R. Gámez P., M. E. Galindo T., I. Landero T., L. Iglesias A. y N. Santana B. 2009. Encapsulación de embriones somáticos de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii* para la producción de semilla sintética. Revista Chapingo Serie Horticultura 15(2): 33-40
- [37] Murashigue T y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiología Plantarum 15:473-497.
- [38] Aguilar M., M. y A. López E. 2013. Germinación *in vitro* de *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr., una herramienta para su conservación *ex situ*. Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas. 5:18-24.
- [39] Avila D., I., K. Oyama, C. Gomez A. y R. Salgado G. 2009. *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia Speciosa*. Plant Cell Tiss Cult 99:335-343.

- [40] Velasco L., O. y P. B. Beltrán. 2008. Orquídeas del Parque Natural Sierra de Grazalema. Consejería del Medio Ambiente. Sevilla. pp: 47-86.
- [41] Santos M., L. Aguirres, C. Campos y G. Martínez. 2006. Conservación in situ de la flora mexicana: La orquídea *Laelia albida*, en una reserva de la biosfera. Ciencia y Desarrollo. 1-10.
- [42] Avila D., I. 2007. Biología de poblaciones *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. (Orchidaceae) para su manejo y conservación. Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones en ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México. p: 162.
- [43] Maya R., G. 2010. Sistema de apareamiento y tasa de exocruzamiento de *Laelia speciosa* (HBK) Schltr (Orchadaceae) en poblaciones sujetas a diferente grado de perturbación. Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. p: 72.
- [44] Mata R., M. y V. M. Salazar R. 2009. Propagation and Establishment of Tree Endangered Mexican Orchids from Protocorms. HortScience 44(5):1395-1399.
- [45] Flores E., G., J. P. Legaria S., I. Gil V. y M.T. Colinas L. 2008. In vitro propagation of *Oncidium stramineum* Lindl., an endangered endemic mexican orchid. Revista Chapingo. 14(3), 347-353
- [46] Lee E., H.E., A. Laguca C., J. Murguía G., P. Elroza M., L. Iglesias A., B. García R., F. A. Barredo P. y N. Santasana Buzzy. 2007. Regeneración *In vitro* de *Laelia anceps* ssp. *Dawsonii*. Revista Científica UDO Agrícola. 7(1): 58-67.
- [47] Castañeda Z., M. 2008. Alberico, L. 2004. Propagación y Conservación de Lirio de Todos Santos *Laelia anceps* Lindl. subsp. *anceps* f. *semialba* (Orchidaceae) a través del cultivo de Tejidos. Universidad Veracruzana. Tesis.

- [48] Young, P. S., H.N. Murthy y P. K. Yoeup. 2000. Mass multiplicaction of protcorn-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 63:67-72.
- [49] Beyl, C. A. 2005. Getting started with tissue culture: media preparation, sterile technique, and laboratory equipment. In: Trigiano R.N. & Gray D. J. (ed). *Plant Tissue Culture, Development and Biotechnology*. CRC Press, Bosa Roca. pp: 11-26.
- [50] George,P. S. y G. A. Ravishankar. 1997. *In vitro* multiplication of *Vanilla planifolia* using axillary bud explants. *Plant Cell Reports*. 16:490-494.
- [51] Kalimuthu, K., R. Senthilkumar and N. Murugalatha. 2006. Regeneration of *Vanilla planifolia* Andr.- a tropical orchid. *Current Science*. 9(10):1401-1403.
- [52] Decruse, S.W., A. Gangaprasad, S. Seeni y V. Sarojini M. 2003. Micropropagation and ecorestoration of *Vanda spathulata*, an exquisite orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 72:199-202.

## ANEXOS

### ANEXO A

Protocolo para la multiplicación *in vitro*  
de protocormos de *Laelia speciosa*.

### ANEXO B

Protocolo para la multiplicación *in vitro*  
de plantas de *Laelia speciosa* a partir de yemas axilares

## ANEXO A

### Protocolo para la multiplicación *in vitro* de protocormos de *Laelia speciosa*.

1. Utilizar protocormos de *Laelia speciosa*, previamente germinados *in vitro* de manera asimbiótica.
2. Sembrarlos en frascos de vidrio con 50 ml de medio de cultivo MS (pH 5.8, Sacarosa 3%, y 3 gL<sup>-1</sup> de phytigel) adicionado con 1mgL<sup>-1</sup> de 2iP, en condiciones estériles en campana de flujo laminar. Colocando uno o dos protocormos por frasco.
3. Colocar los frascos en cuarto de incubación a 24°C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad por 90 días.
4. Posteriormente, subcultivar, separando los PLB's y los brotes en al menos 4 frascos por frasco original, en el mismo medio MS mas 1 mgL<sup>-1</sup> de 2iP.
5. Repetir el subcultivo en el medio descrito, hasta obtener la cantidad de PLB's requerida.
6. Si se busca inducir la organogénesis de hojas y raíces, subcultivar en medio MS sin la adición de 2iP, hasta observar la formación de raíces en la plántula (aprox. 30 días), y posteriormente subcultivar individualizando las plántulas, en frascos de vidrio con 150 ml de medio MS adicionado con Carbón Activado a una concentración de 2gL<sup>-1</sup> y colocar cuarto de incubación a 24°C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad por 90 días.

## ANEXO B

### Protocolo para la multiplicación *in vitro* de plantas de *Laelia speciosa* a partir de yemas axilares

1. Como explante se utilizarán plántulas de *Laelia speciosa* de 2-3 cm de altura, a los cuales se retirará el extremo radical por medio de un corte limpio con bisturí.
2. Cultivar los explantes en frascos de vidrio con 150 ml de medio de cultivo MS (pH 5.8, Sacarosa 3%, y 3 gL<sup>-1</sup> de phytigel) adicionado con 3mgL<sup>-1</sup> de BA, en condiciones estériles en campana de flujo laminar. Colocando 4 o 5 explantes por frasco.
3. Colocar los frascos en cuarto de incubación a 24°C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad por 60 días.
4. Posteriormente, subcultivar, individualizando los brotes obtenidos (sin raíces) en el mismo medio de cultivo descrito previamente para continuar la multiplicación hasta obtener la cantidad deseada.
5. Para la regeneración de plántulas, se realiza un subcultivo en frascos con 150 ml de medio MS adicionado con 2gL<sup>-1</sup> de Carbón Activado, de los brotes individualizados, sin retirar su raíces si ya las presenta, y se colocan en cuarto de incubación a 24°C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad durante 60 -90 días.