



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL

MORFOGÉNESIS *in vitro* DE *Prosthechea vitellina* (Lindley) W. E. Higgins

YAZMÍN MORA CRUZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2021

La presente tesis titulada **Morfogénesis *in vitro* de *Prosthechea vitellina* (Lindley) W. E. Higgins**, realizada por la alumna: **YAZMÍN MORA CRUZ**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

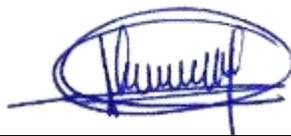
**MAESTRA EN CIENCIAS
POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FISIOLOGÍA VEGETAL**

CONSEJO PARTICULAR



CONSEJERO

DRA. MARÍA CRISTINA GUADALUPE LÓPEZ PERALTA



ASESOR

DR. ELEODORO HERNÁNDEZ MENESES



ASESOR

DR. NICACIO CRUZ HUERTA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, noviembre de 2021.

MORFOGÉNESIS *in vitro* DE *Prosthechea vitellina* (Lindley) W. E. Higgins

Yazmín Mora Cruz, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2021

RESUMEN

Prosthechea vitellina (Lindley) W.E. Higgins es una orquídea epífita endémica de México con valor ornamental y económico. Considerada especie amenazada debido al comercio ilegal y la creciente destrucción de su hábitat. Ante esta problemática es necesario implementar técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* como opción viable para rescate, conservación y propagación masiva. Los objetivos fueron determinar las mejores condiciones para la germinación *in vitro*, regenerar plántulas por organogénesis directa y aclimatarlas. Se sembraron semillas provenientes de capsula cerrada en medio MS a la mitad de concentración de sales (50%) adicionado con 6-benciladenina (BA, 2.22, 4.44 μM) y ácido naftalenacético (ANA, 0.44 μM). La organogénesis se indujo a partir de plántulas germinadas *in vitro*, sembradas en medio MS (100% y 50%) con BA (5.0-10.0 μM) ANA y AIA (1.0-2.0 μM). En alargamiento grupos de brotes se colocaron en medio MS (100% y 50%) con y sin carbón activado (0.5 g L⁻¹). En multiplicación, brotes (1.8 cm) se cultivaron en medio MS con BA (4.5- 13.6 μM), ANA y AIA (0.0- 1.14 μM). En enraizamiento se cultivaron brotes en medio MS (50%) adicionado con AIB, AIA Y ANA (0.0-10.0 μM). En aclimatación se evaluaron plantas enraizadas *in vitro* de 5 y 7 cm en turba+perlita (1:1) y corteza de pino. La germinación fue de 91.8%. En organogénesis la mayor cantidad de brotes (2.03) se indujeron con 10.0 μM de BA +1.0 μM de ANA y en multiplicación se obtuvieron 2.5 brotes con 4.5 μM de BA y 1.14 μM de AIA a las ocho semanas. El alargamiento mayor de brotes (2.16 cm) se logró con MS (50%) + 0.5 g L⁻¹ de carbón activado. El mayor número de raíces se produjo con 10 μM de AIB con 5.27 raíces por planta. La supervivencia fue de 100% con plantas de 7 cm en corteza de pino.

Palabras clave: endémica, epífita, organogénesis, orquídea, propagación *in vitro*.

***In vitro* MORPHOGENESIS OF *Prosthechea vitellina* (Lindley) W. E. Higgins**

**Yazmín Mora Cruz, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2021**

ABSTRACT

Prosthechea vitellina (Lindley) W.E. Higgins is an epiphytic orchid endemic to Mexico with ornamental and economic value. Considered a threatened species due to illegal trade and the increasing destruction of its habitat. Given this problem, it is necessary to implement *in vitro* plant tissue culture techniques as a viable option for rescue, conservation and mass propagation. The objectives were to determine the best conditions for germination *in vitro*, to regenerate seedlings by direct organogenesis and to acclimatize them. Seeds from closed capsule were sown in MS medium at half salt concentration (50%) added with 6-benzyladenine (BA, 2.22, 4.44 μM) and naphthaleneacetic acid (ANA, 0.44 μM). Organogenesis was induced from *in vitro* germinated seedlings, placed in MS medium (100% and 50%) with BA (5.0-10.0 μM), ANA and AIA (1.0-2.0 μM). In elongation, groups of shoots were placed in MS medium (100% and 50%) with and without activated charcoal (0.5 g L⁻¹). In multiplication, shoots (1.8 cm) were placed in MS medium with BA (4.5- 13.6 μM), ANA and AIA (0.0-1.14 μM) were added. During rooting, shoots were grown in MS medium (50%) added with AIB, AIA and ANA (0.0-10.0 μM). In acclimatization, *in vitro* rooted plants of 5 and 7 cm in peat + perlite (1: 1) and pine bark were evaluated. Germination was 91.8%. In organogenesis, the highest number of shoots (2.03) were induced with 10.0 μM of BA +1.0 μM of ANA and in multiplication 2.5 shoots were obtained with 4.5 μM of BA and 1.14 μM of IAA at eight weeks. The greatest elongation of shoots (2.16 cm) was achieved with MS (50%) + 0.5 g L⁻¹ of activated charcoal. The highest number of roots was produced with 10 μM IBA with 5.27 roots per plant. Survival was 100% with 7 cm plants in pine bark.

Key words: endemic, epiphytic, organogenesis, orchid, *in vitro* propagation.

DEDICATORIA

A mi familia

A mis padres por todo el apoyo brindado a lo largo de estos años, por motivarme y alentarme cada día para culminar con éxito el presente trabajo.

A mi hija y esposo quienes fueron el motor e impulso para lograr mis metas, por siempre estar a mi lado brindándome su apoyo y cariño.

A mis hermanos por el apoyo incondicional a lo largo de mi vida, por su amistad y cariño.

A mis profesores

A mi consejera, Dra. María Cristina Guadalupe López Peralta por las múltiples enseñanzas en lo personal y académico.

A mis asesores Dr. Eleodoro Hernández Meneses y Dr. Nicacio Cruz Huerta por la asesoría y tiempo invertido en este proceso.

A mis amigos

Por brindarme su amistad sincera e incondicional, apoyo, risas y cariño.

AGRADECIMIENTOS

Al **Colegio de Posgraduados**, Campus Montecillo; al Posgrado de Recursos Genéticos y Productividad- Fisiología Vegetal por otorgarme la oportunidad de cursar los estudios de nivel Maestría y por todas las facilidades prestadas.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT) por brindarme el apoyo económico para solventar los gastos y poder culminar mis estudios de postgrado.

A mis **padres y mi familia** quienes siempre me han brindado su apoyo en todo momento a lo largo de toda mi vida académica.

A **mi esposo** por el apoyo, cariño, motivación y paciencia durante esta etapa académica. **A mi hijita** por brindarme su inmenso amor incondicional.

A la **Dra. Ma. Cristina López Peralta**, un agradecimiento especial por la infinita comprensión y paciencia, muchas gracias por su asesoría, por encaminar mi trabajo con sus conocimientos y por permitirme concluirlo. Le agradezco de sobremanera sus palabras de aliento, su amistad y cariño.

Al Dr. **Eleodoro Hernández Meneses** por sus enseñanzas y tolerancia, por contribuir de manera excepcional en la culminación de esta investigación y al **Dr. Nicacio Cruz Huerta** por compartir sus conocimientos y su amplia experiencia.

A mi compañero y amigo **Jonathan Márquez** por brindarme su amistad y compartir sus conocimientos conmigo.

A la **Ing. Laura** por brindarme su apoyo y amistad y a todos con los que compartí espacio y momentos en el laboratorio de Biotecnología.

Muchas gracias.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	6
2.1 Objetivo general.....	6
2.2 Objetivos específicos	6
2.3 Hipótesis.....	6
III. REVISIÓN DE LITERATURA	7
3.1 Generalidades de las Orquídeas	7
3.1.1 Descripción botánica	7
3.1.2 Ecología	12
3.1.3 Importancia económica.....	13
3.2 Generalidades de <i>Prosthechea vitellina</i> (Lindley)	13
3.2.1 Descripción botánica	13
3.2.2 Importancia del género	17
3.3 Cultivo de orquídeas	17
3.3.1 Requerimientos del cultivo.....	17
3.3.2 Plagas y enfermedades	19
3.3.3 Propagación sexual	19
3.3.4 Propagación asexual	20
3.4 Cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i>	21
3.4.1 Totipotencia celular.....	22
3.4.2 Morfogénesis <i>in vitro</i>	23
3.4.3 Organogénesis <i>in vitro</i>	25
3.4.4 Embriogénesis somática.....	25
3.5 Factores que afectan los procesos morfogénicos <i>in vitro</i>	26

3.5.1 El genotipo.....	26
3.5.2 El explante.....	26
3.5.3 Medio de cultivo.....	27
3.5.4 Reguladores de crecimiento vegetal.....	28
3.5.5 Antioxidantes y adsorbentes.....	30
3.5.6 Fuente de Carbono.....	30
3.5.7 Otros suplementos.....	30
3.6 Cultivo <i>in vitro</i> de Orquídeas.....	31
3.6.1 Medios de cultivo.....	31
3.6.2 Tipos de explantes.....	33
3.6.3 Reguladores de crecimiento.....	33
3.6.4 Métodos asépticos.....	34
3.7 Cultivo <i>in vitro</i> del género <i>Prosthechea</i>	35
3.7.1 Medios de cultivo.....	35
3.7.2 Tipos de explantes utilizados <i>in vitro</i>	37
3.7.3 Reguladores del crecimiento.....	37
3.7.4 Métodos asépticos.....	37
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
4.1 Material vegetal.....	39
4.2 Medio de cultivo y condiciones de incubación.....	40
4.3 Establecimiento del cultivo aséptico.....	41
4.4 Germinación <i>in vitro</i>	41
4.4.1 Variables cuantificadas.....	42
4.4.2 Diseño experimental y análisis.....	43
4.5 Regeneración de plántulas por organogénesis.....	43
4.5.1 Inducción de brotes.....	43
4.5.2 Variables cuantificadas y análisis estadístico.....	44
4.6 Alargamiento de brotes.....	45
4.6.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico.....	45
4.7 Multiplicación de brotes.....	45

4.7.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico.....	46
4.8 Enraizamiento de plantas	46
4.8.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico.....	47
4.9 Aclimatación de plántulas	47
4.9.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico.....	48
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
5.1 Establecimiento del cultivo aséptico.....	49
5.2 Germinación <i>in vitro</i>	49
5.3 Regeneración de plantas por organogénesis directa	52
5.3.1 Inducción de brotes	52
5.3.2 Alargamiento de brotes.....	55
5.3.3 Multiplicación de brotes	56
5.3.4 Enraizamiento de plántulas.....	59
5.3.5 Aclimatación de plántulas	62
VI. CONCLUSIONES.....	65
VIII. LITERATURA CITADA	66
APÉNDICE	80

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Auxinas comúnmente usadas en el cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i> (Gamborg, 2002).....	29
Cuadro 2. Citocininas comúnmente utilizadas en el cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i>	29
Cuadro 3. Formulación de medios de cultivo, empleados en el cultivo <i>in vitro</i> de orquídeas (Mayo <i>et al.</i> 2007).....	32
Cuadro 4. Concentraciones de 6-benciladenina (BA) y ácido 1- naftalenacético (ANA) evaluadas en la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Prosthechea vitellina</i>	41
Cuadro 5. Estadios ontogénicos observados durante el proceso de germinación <i>in vitro</i> de <i>Prosthechea vitellina</i> *.	42
Cuadro 6. Concentraciones 6-benciladenina (BA), ácido 1-naftalenacético (ANA) y ácido indolacético (AIA) evaluadas en la inducción de brotes de <i>Prosthechea vitellina</i>	44
Cuadro 7. Concentraciones de 6-benciladenina (BA), ácido 1-naftalenacético (ANA) y ácido indolacético (AIA) evaluadas en la multiplicación de brotes de <i>Prosthechea vitellina</i>	46
Cuadro 8. Concentraciones de ácido indol-3-butírico (AIB), ácido indolacético (AIA) y ácido 1-naftalenacético (ANA) evaluadas en el enraizamiento de brotes de <i>Prosthechea vitellina</i>	47
Cuadro 9. Número de brotes por explante (BE) y longitud de brotes (LB) inducidos en plántulas <i>in vitro</i> de <i>Prosthechea vitellina</i> con 6-benciladenina (BA), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolacético (AIA) a las ocho semanas de cultivo.....	53
Cuadro 10. Número de brotes por explante (BE) y longitud del brote (BE) en <i>Prosthechea vitellina</i> con 50% y 100% de la concentración del medio MS y 0.5 g L ⁻¹ de carbón activado (CA) a las ocho semanas de cultivo.....	55

Cuadro 11. Número de brotes por explante (BE), longitud de brotes (LB) y Brotación (B, %) inducidos en plántulas <i>in vitro</i> de <i>Prosthechea vitellina</i> con 6-benciladenina (BA), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolacético (AIA) a las ocho semanas de cultivo.	57
Cuadro 12. Enraizamiento <i>in vitro</i> de plántulas de <i>Prosthechea vitellina</i> con ácido indol-3-butírico (AIB), ácido indolacético (AIA) y ácido naftalenacético (ANA) a las cuatro y ocho semanas de cultivo.	59
Cuadro 13. Aclimatación de plántulas de <i>Prosthechea vitellina</i> con tamaño de 5 y 7 cm con sustrato de corteza de pino (CP) y turba+ Perlita (T+P) después de 4 y 8 semanas.	62
CUADROS APÉNDICE	
Cuadro A.1. Composición química del medio basal MS (Murashige y Skoog (1962).	80
Cuadro A.2. Cuadrados medios y su significancia del análisis del número y longitud de los brotes en la inducción <i>in vitro</i> de <i>P. vitellina</i> después de ocho semanas de cultivo	80
Cuadro A.3. Cuadrados medios y su significancia del análisis de número y altura de brotes en el alargamiento <i>in vitro</i> de <i>P. vitellina</i> después de ocho semanas de cultivo	81
Cuadro A.4. Cuadrados medios y su significancia del análisis de la brotación, longitud y número de brotes en la multiplicación <i>in vitro</i> de <i>P. vitellina</i> después de ocho semanas de cultivo.....	81
Cuadro A.5. Cuadrados medios y su significancia del análisis de número de raíces en el enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>P. vitellina</i> después de cuatro y ocho semanas de cultivo.....	82
Cuadro A.6. Cuadrados medios y su significancia del análisis de supervivencia a las cuatro y ocho semanas de cultivo.	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hábito de crecimiento de las orquídeas. a) Crecimiento simpodial, b) Crecimiento monopodial (Bell y Bryan, 1991; Martija, 2007).	8
Figura 2. Morfología floral de la Orquídea (Téllez, 2011).	10
Figura 3. Morfología del fruto y semilla de orquídeas. a) Fruto (Malena Barreto, 1997); b) semilla y embrión de <i>Prosthechea</i> sp. (Banda-Sánchez <i>et al.</i> , 2017).	11
Figura 4. Flor y ejemplar en floración de <i>Prosthechea vitellina</i> en hábitat natural.	15
Figura 5. Lámina descriptiva de <i>Prosthechea vitellina</i> (Téllez, 2011).	16
Figura 6. Esquema de las diferentes rutas morfogénicas.	23
Figura 7. Esquema de los diferentes procesos morfogénicos obtenidos a partir de la siembra <i>in vitro</i> de diferentes explantes. Las líneas continuas expresan organogénesis o embriogénesis directa mientras que las líneas quebradas indican que la morfogénesis se obtiene por vía indirecta (Calva y Pérez, 2005).	24
Figura 8. Diagrama de flujo para la morfogénesis <i>in vitro</i> de <i>Prosthechea vitellina</i>	39
Figura 9. Flores y frutos de <i>Prosthechea vitellina</i> . a) Flores; b) Cápsula inmadura de 90 días de edad; c) Cápsula madura de 210 días; d) Cápsula abierta con semillas extraídas manualmente.	40
Figura 10. Plántulas de <i>Prosthechea vitellina</i> de la misma edad utilizadas como explantes en la inducción de brotes <i>in vitro</i> . (A) Plántula de 1.5 cm de altura y sin raíz; (B) Plántula de 1.8 cm de altura; (C) Plántula de 2 cm de altura con hojas más desarrolladas.	43
Figura 11. Estadios ontogénicos en la germinación <i>in vitro</i> de <i>Prosthechea vitellina</i> a lo largo de 22 semanas.	50
Figura 12. Proceso de imbibición y formación de primordio foliar en semillas de <i>Prosthechea vitellina</i> en condiciones <i>in vitro</i> a lo largo de 60 días.	51
Figura 13. Inducción de brotes <i>in vitro</i> en explantes de <i>Prosthechea vitellina</i> después de cuatro semanas de su siembra en dos concentraciones de	

medio MS (1962) suplementado con 6-benciladenina (BA, 5 y 10 μM), ácido 1-naftalenacético (ANA, 1.0 y 2.0 μM) y ácido indolacético (AIA, 1.0 y 2.0 μM).	54
Figura 14. Inducción de brotes <i>in vitro</i> de <i>Prosthechea vitellina</i> en medio MS completo con A) y B) 10 μM BA + 1 μM ANA y C) 10 μM BA + 2 μM ANA después de ocho semanas de cultivo.....	54
Figura 15. Multiplicación de brotes <i>in vitro</i> de <i>Prosthechea vitellina</i> en medio MS con la mitad de concentración de las sales con A) 4.5 μM BA + 1.14 μM AIA y B) 4.5 μM BA + 1.14 μM ANA después de ocho semanas de cultivo.	58
Figura 16. Enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Prosthechea vitellina</i> en medio MS a la mitad de concentración de sales con A) y B) 2.46 μM de AIB después de cuatro semanas de cultivo.....	60
Figura 17. Enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Prosthechea vitellina</i> en medio MS a la mitad de concentración de las sales minerales con A) y B) 10 μM de AIB después de ocho semanas de cultivo.....	60
Figura 18. Aclimatación de plantas de <i>Prosthechea vitellina</i> . A) Plantas después de ocho semanas; B) Planta de 7 cm de altura en corteza de pino y C) Planta de 5 cm de altura en turba + perlita (1:1) a las cuatro semanas.	63

I. INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae comprende más de 900 géneros y es una de las familias más grandes y diversas de plantas con flores. Las orquídeas habitan en un amplio rango de condiciones ambientales, se pueden encontrar en todas partes del mundo y en la mayoría de los nichos ecológicos; las flores varían mucho en tamaño, forma y color, presentan estructuras y características fisiológicas altamente especializadas (Goh y Arditti, 2018). Una de las características por las que se aprovechan como plantas ornamentales es la gran variedad de las flores en tamaño, forma y color junto con su larga vida útil, razones de la importancia hortícola de las flores de orquídeas y por ello gran número de especies se han cultivado e hibridado para su comercialización (Cabral, 2010).

En varios países tropicales, las orquídeas se han convertido en un importante cultivo de exportación de flores cortadas (Goh y Arditti, 2018). De acuerdo con Soto-Arenas *et al.* (2015) existen cerca de 30,000 especies de orquídeas de las cuales México alberga más de 1,260 que representan el 4.2% del total de especies. Téllez (2011) menciona que el porcentaje de endemismo es de 40% de especies y 8% de géneros.

Las orquídeas se concentran generalmente en áreas específicas, que son importantes por la riqueza y diversidad de sus poblaciones o por sus endemismos. Téllez (2011) menciona que en México se han identificado seis áreas de gran diversidad, con menos de 100,000 ha cada una, localizadas en regiones florísticas del país, las cuales poseen 50% del total de especies registradas y que representan tan sólo 0.003% del territorio mexicano. Estas áreas son de gran importancia para estrategias de conservación.

La mayoría de las especies de la familia Orchidaceae se encuentran amenazadas por la pérdida de su hábitat (Villaseñor, 2010), las más vulnerables son las epífitas, por la desventaja de crecer sobre los árboles de selvas y bosques y que son destruidos por la tala inmoderada (Menchaca *et al.*, 2011). Además, la reproducción de las orquídeas a partir de semillas es limitante en todas las especies debido a que son vulnerables y

requieren condiciones estrictas de luz, temperatura, humedad (Solano-Gómez *et al.*, 2008) y relaciones simbióticas con hongos.

El estado de Oaxaca alberga la mayor diversidad de orquideoflora del país con aproximadamente 700 especies distribuidas en 144 géneros y cuatro subespecies, que es más de la mitad de las orquídeas reportadas para México. Las especies registradas para Oaxaca pertenecen a las cuatro subfamilias de orquídeas presentes en México dentro de 21 de las 37 subtribus (Soto-Arenas y Salazar, 2004; Cox, 2013).

Prosthechea vitellina es una de las 700 especies que alberga el estado de Oaxaca y de acuerdo con lo establecido por la NOM-059-SEMARNAT (SEMARNAT, 2010), es una orquídea ubicada en categoría de protección especial (Pr).

Dos factores determinantes que han contribuido a la pérdida de material genético de las orquídeas, y muchas otras especies vegetales, es el saqueo y comercio ilegal. Entre los años de 1993 a 1996 se estimó la pérdida de entre 9 y 12 millones de plantas (Téllez, 2011). Para las especies silvestres con valor ornamental el factor esencial de la pérdida de especies ha sido la extracción desmedida de especímenes de sus hábitats naturales para abastecer la demanda creciente. Desafortunadamente estos especímenes salen del país para incrementar colecciones privadas en Estados Unidos, Europa y Japón. A pesar de las leyes vigentes que prohíben estas prácticas las plantas continúan colectándose y comercializándose en el mercado negro. Es complicado contrarrestar o eliminar la comercialización de ejemplares ilegales, debido a que constituyen una fuente de ingreso para muchas familias (Emeterio-Lara *et al.*, 2016).

La Unión Internacional para la conservación de la Naturaleza (IUCN) ubica 260 especies de orquídeas mexicanas en la lista de especies en peligro de extinción. De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana 2010, 188 especies están catalogadas en algún estado de conservación, 15 están en peligro de extinción, 62 se encuentran amenazadas, 110 están sujetas a protección especial y una se encuentra extinta en la naturaleza (SEMARNAT, 2010).

La Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA) ha confiscado gran número de ejemplares y los ha donado a instituciones que se encargan de su conservación in situ y ex situ. Sin embargo, estos esfuerzos han sido insuficientes para contrarrestar este delito.

Prosthechea vitellina no ha escapado de esta problemática generalizada para las orquídeas y también enfrenta la sobrecolecta de ejemplares silvestres que se comercializan, con raíz desnuda y próximos a floración, en calles y mercados de algunas ciudades del país como plantas ornamentales exóticas. Por la vistosidad y elegancia de sus flores, la especie se ha utilizada como progenitora en cruzamientos intergenéricos para la obtención de híbridos, que eventualmente alcanzan calidad comercial (CONABIO, 2010). En décadas pasadas el comercio de ejemplares silvestres a Europa y Estados Unidos fue una práctica común. En la actualidad el comercio internacional de esta orquídea está regulado por la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies (CITES).

La condición de especie amenazada de *P. vitellina* propicia la búsqueda de estrategias que resuelvan los problemas de reproducción de la especie en su ambiente natural. Si bien las cápsulas contienen gran cantidad de semillas, la germinación en su ambiente natural requiere la asociación simbiótica con hongos específicos y de condiciones óptimas de luz, humedad y temperatura. Una opción es el uso de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. La propagación *in vitro* de orquídeas amenazadas o sujetas a protección especial es una forma viable para obtener gran cantidad de plantas con fines de rescate, conservación, reintroducción y aprovechamiento comercial sostenible. La germinación asimbiótica *in vitro* ha sido exitosa en gran cantidad de especies de orquídeas silvestres y también se ha convertido en una técnica frecuente para la obtención de nuevos híbridos comerciales (Arditti y Ghani, 2000).

Las flores de *P. vitellina* poseen características morfológicas naturalmente visibles que las distingue de sus congéneres en México. Hágsater *et al.*, (2005) reportaron que esta especie es la única con sépalos y pétalos de color rojo-anaranjados, y el labelo y columna

amarillos. Además, Cruz *et al.* (2014) coincidieron que en México las orquídeas nativas y endémicas son apreciadas por su valor ornamental o medicinal.

En el estado de Oaxaca de acuerdo con Cruz *et al.*, (2014) existen diversas especies del género *Prosthechea* que se usan con fines medicinales, sobre todo en comunidades de la región Mixteca. Además, Argueta y Aguilar (1993) indican que en esta región existen comunidades indígenas que no tienen acceso a los servicios médicos y usan estas especies por sus propiedades medicinales reconocidas desde tiempos ancestrales.

Hágsater *et al.* (2005) y Cox (2013) reportaron el valor que posee la naturaleza aglutinante de los mucilagos de los pseudobulbos para la fabricación de instrumentos musicales y plumería. Las flores son importantes en la elaboración de las calaveritas del día de muertos en el estado de Yucatán. También se emplean en festividades religiosas para la elaboración de guirnaldas, coronas y ramilletes que aportan colorido y aromas a los altares. Fuera de México el comercio lícito de esta especie se realiza en invernaderos de orquídeas de Estados Unidos y Europa. Los ejemplares se pueden obtener de manera directa con los viveros, pero también a través de compras en línea, en otros casos, durante exposiciones de las asociaciones de aficionados a las orquídeas que cada año se realizan en varias partes de Estados Unidos. Los precios de las plantas fluctúan de 22 a 35 dólares; este comercio básicamente se hace con ejemplares vivos importados desde México. Entre los años 2000 y 2007 el país exportó un total de 1,647 ejemplares de diversas especies, el principal destino de ellos fue Japón, Estados Unidos, China y en menor medida Gran Bretaña, Alemania y Taiwán (CONABIO, 2010).

Como planta ornamental *Prosthechea vitellina* posee características únicas que resaltan entre otras especies. Por la elegancia y coloración de sus flores es ampliamente apreciada en la horticultura ornamental, tanto a nivel nacional como internacional. En la región de Orizaba-Xalapa, Ver. esta orquídea recibe el nombre común de "manuelitos" debido a que su época de floración coincide con la festividad de Corpus Christi y las plantas se usan como elementos decorativos (CONABIO, 2010). Cox (2013) reportó que las orquídeas son un grupo de plantas de interés y que poseen gran potencial principalmente de uso ornamental y hortícola.

Aunque *P. vitellina* no es endémica de México tiene una amplia distribución. Menchaca *et al.* (2012) mencionan que la especie se concentra en los estados de Puebla, Oaxaca, Chiapas y Veracruz. En algunos bosques de pino esta especie llega a ser una de las epífitas de mayor dominancia en términos de abundancia. Es una orquídea de flores vistosas y coloración atractiva que ha tenido importancia hortícola desde el siglo XIX (Sarmiento y Romero, 2000). En México es común observarla en jardines de casas, colecciones privadas y jardines botánicos. También ha sido una de las orquídeas mexicanas de mayor presencia en el arte (UNIBIO, 2011).

Por los antecedentes expuestos y por la necesidad de contribuir con estrategias de conservación y aprovechamiento de *Prosthechea vitellina* el presente estudio tuvo como objetivo establecer las condiciones óptimas para la regeneración *in vitro* de esta orquídea vía organogénesis a partir de semillas colectadas en campo.

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivo general

Establecer las condiciones óptimas para la regeneración *in vitro* de la orquídea *Prosthechea vitellina* por organogénesis.

2.2 Objetivos específicos

- Definir el método de desinfección superficial de cápsulas de *P. vitellina* para el establecimiento del cultivo aséptico.
- Establecer las condiciones óptimas de medio de cultivo y reguladores de crecimiento para la germinación *in vitro* de *P. vitellina*.
- Determinar las condiciones óptimas de medio de cultivo y reguladores de crecimiento para la inducción y multiplicación de brotes a partir de diferentes de explantes de *P. vitellina*.
- Definir las condiciones óptimas de medio de cultivo y reguladores de crecimiento para el enraizamiento *in vitro* de brotes de *P. vitellina*.
- Establecer el proceso de aclimatación de plantas de *P. vitellina* obtenidas *in vitro*.

2.3 Hipótesis

- El establecimiento del cultivo aséptico de semillas de *P. vitellina* está determinado por el tipo y concentración de agente desinfectante empleado, así como del tiempo de inmersión.
- Las respuestas morfogénicas de *P. vitellina* dependen del tipo de explante y de las combinaciones de reguladores del crecimiento empleadas en cada etapa de la ruta morfogénica.
- Es posible aclimatar plántulas propagadas *in vitro* de *P. vitellina*.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Generalidades de las Orquídeas

3.1.1 Descripción botánica

Hábito: las orquídeas son plantas herbáceas, perennes (raramente anuales), epífitas, en ocasiones terrestres o litófitas, ocasionalmente trepadoras, algunas veces saprófitas o raramente, micoparásitas (García-Cruz *et al.*, 2003; Menchaca *et al.*, 2011). Las terrestres presentan raíces fibrosas engrosadas y pueden presentar dos tubérculos, cada año emerge uno nuevo y el original muere. En las epífitas, las raíces presentan epidermis pluriestratificada de 6-7 capas, llamada velamen que actúa como esponja y permite a la raíz inmovilizar una reserva de humedad y minerales. También puede servir como una protección mecánica que participa en la reducción de pérdida de agua por el córtex (Solano *etal.*, 2007). Tienen un pseudobulbo especializado en el almacenamiento de agua y nutrientes, a partir de los cuales emergen las hojas.

El crecimiento de las orquídeas se organiza en dos principales sistemas: simpodial y monopodial (Martija, 2007) (Figura 1). En el primero las flores se desarrollan de un rizoma (tallo horizontal y rastro), el cual tiene la función de almacenar agua. En el monopodial las hojas se desarrollan alternadamente en el tallo que crece vertical y las flores emergen de las raíces aéreas, las cuales crecen en la axila foliar. Hágsater *et al.* (2005) mencionan que las orquídeas mexicanas de crecimiento monopodial son principalmente las vainillas, en los géneros *Campylocentrum*, *Dendrophylax* y *Dichaea* y en algunas especies de *Epidendrum*; las de crecimiento simpodial son de los géneros *Cattleya*, *Laelia*, *Oncidium* y *Cymbidium*.

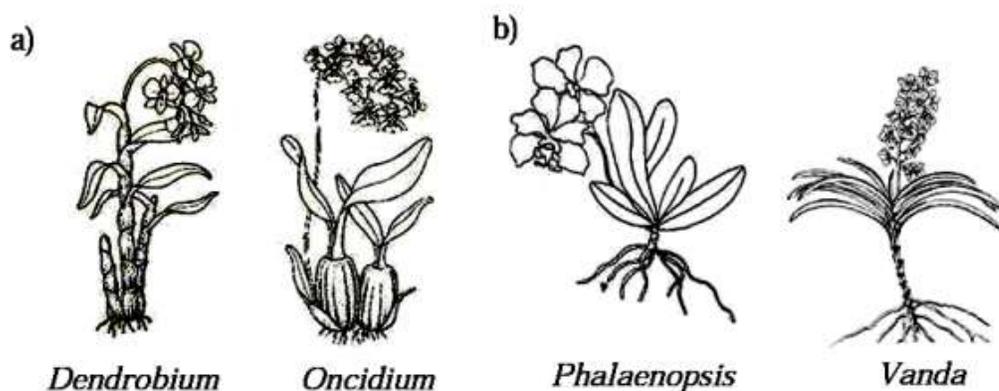


Figura 1. Hábito de crecimiento de las orquídeas. a) Crecimiento simpodial, b) Crecimiento monopodial (Bell y Bryan, 1991; Martija, 2007).

Raíz: las raíces de las orquídeas son órganos que presentan diferentes adaptaciones de acuerdo con la especie (Hágsater *et al.*, 2005). En las especies terrestres las raíces son iguales a la de cualquier otra planta: alargadas y ramificadas, cubiertas con pelos absorbentes; sin embargo, en las epífitas las raíces son aéreas colgantes o unidas a la corteza de los troncos. Tanto en las terrestres como epífitas y litófilas, las raíces están protegidas por un tejido esponjoso de células muertas de color blanco o gris, llamado velamen. En el extremo de la raíz de las epífitas existe una zona verde que tiene la función de realizar fotosíntesis y mantienen simbiosis con micorrizas, importante para el desarrollo y nutrición de ambos organismo (Menchaca *et al.*, 2011).

Hojas: son alternas, dispuestas dísticamente, opuestas o verticiladas, a veces todas reducidas a escamas o todas basales, simples y enteras, abrazadoras en la base con vaina generalmente cerrada (Cabral, 2010; Menchaca *et al.*, 2011). Son variables en forma, tamaño, grosor o textura, características que pueden indicar el lugar o el ambiente de procedencia de las plantas. En condiciones climáticas secas las hojas son carnosas o suculentas y les permiten sobrevivir periodos de sequía. Si el ambiente es mayormente sombreado, las hojas cuentan con una gran superficie que les permite captar la luz, mientras que en ambientes húmedos las hojas son delgadas porque no necesitan almacenar agua. La forma de las hojas va desde oval, casi redonda, lanceolada o casi lineal.

Aunque la mayor parte de las hojas son planas también hay cilíndricas. En general son de color verde, más o menos obscuro, brillante o mate. Algunas con una malla de color

bronce seguido de un color oscuro u olivo; hay hojas manchadas, aunque lo más frecuente es que la superficie de las hojas sea lisa o pubescente. La mayoría de las orquídeas presentan hojas perennes mientras, aunque otras son caducas, como sucede en algunas orquídeas terrestres (García-Cruz *et al.*, 2003; Martija, 2007; Cabral, 2010).

Flores: generalmente son hermafroditas, bilaterales, trímeras con un pétalo modificado llamado labelo; están dispuestas en racimos, panículas o solitarias en las axilas de las hojas o sobre un escapo elevado (Bellone, 2006); aunque en la mayoría de las orquídeas, se agrupan en conjuntos de flores llamadas inflorescencias (Menchaca *et al.*, 2011). También pueden existir, en menor cantidad, flores unisexuales con órganos masculinos o femeninos, como en los géneros *Catasetum*, *Mormodes* y *Cycnoches* (Bertolini *et al.*, 2012). La flor presenta una simetría bilateral y el tamaño de las flores es variable, puede ser desde 3 mm hasta 25 cm de diámetro.

Del exterior al interior de la flor se distinguen tres partes: sépalos (uno dorsal y dos laterales), pétalos (dos laterales y el labelo) y columna. El labelo es diferente a los laterales ya que es de diferente tamaño, forma y color. Esto es para que los polinizadores lo perciban y se acerquen a las flores (Bertollini *et al.*, 2012) (Figura 2). Entre los sépalos y pétalos (laterales) en muchas de las especies no existe una gran diferencia ya que pueden presentar los mismos colores y formas.

El aparato reproductor femenino (pistilo) y el masculino (antera) están fusionados en columna ubicada en el centro de la flor, en la parte superior de la columna se encuentra la antera y en la inferior el estigma, separada de la parte masculina por un tejido llamado rostelo, cuya función es evitar la autopolinización (García-Cruz *et al.*, 2003; Cabral, 2010). Dentro de la flor los granos de polen se aglutinan en polinios cuyo número depende del género. En la base del polinio se encuentra el viscidio, que es una base cubierta de mucílago (sustancia pegajosa) y que cumple la función de adherirse a los agentes polinizadores. Los polinizadores llevan los polinarios de una flor a otra, favoreciendo la polinización entre flores o plantas (Lapiner, 1973; Hágsater *et al.*, 2005; Bellone, 2006).

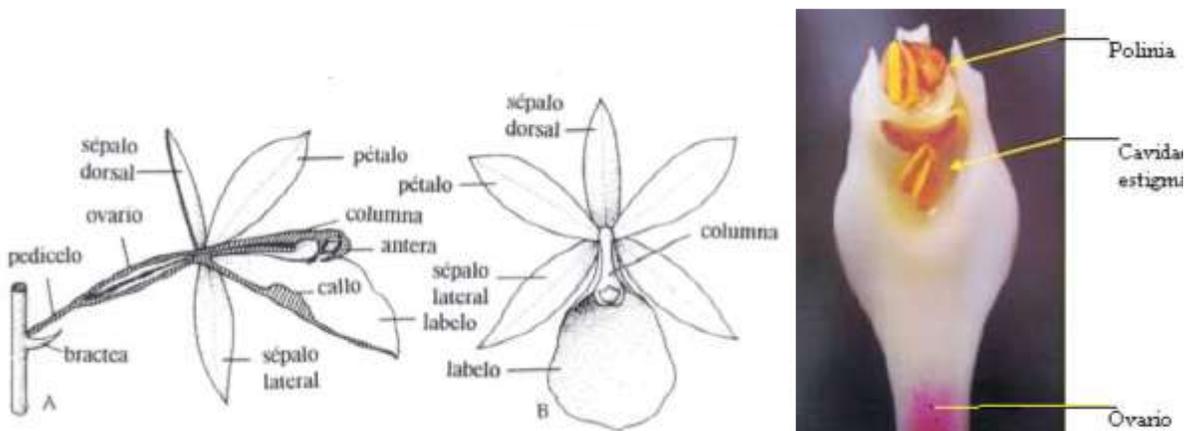


Figura 2. Morfología floral de la Orquídea (Téllez, 2011).

El ovario se ubica abajo de los sépalos y pétalos. A menudo experimenta una torsión que orienta a la flor hacia arriba (resupinación), colocando así al labelo arriba o abajo con lo que funciona como una plataforma o atracción para los polinizadores; como en *Prosthechea citrina*, en donde toda la planta parece invertida, ya que las hojas y las flores crecen hacia abajo (Fanfani y Rossi, 1989; Hágsater, *et al.*, 2005). Las flores poseen una gran diversidad de colores y a veces combinaciones de dos o tres tonalidades en una misma flor. Algunas orquídeas no tienen olor, mientras que la mayoría tienen una gran variedad de fragancias, que van desde muy agradable hasta muy desagradable para el olfato humano (Cabral, 2010).

De acuerdo con Téllez (2011) los aromas de las flores se deben a una sustancia producida en los osmóforos, órganos utilizados por las plantas para atraer a los polinizadores, función que también realiza el néctar, que es un jugo azucarado que segregan las plantas en las glándulas productoras llamadas nectarios.

Fruto: son cápsulas con dehiscencia por 2 o 6 grietas longitudinales, que se desarrollan a partir del ovario inmediatamente después de que se llevó a cabo la polinización, estos pueden tener diversas formas dependiendo de la especie de orquídea (Dressler, 1981; Hágsater *et al.*, 2005). Es el órgano que se forma en la parte inferior de la flor. Después de la polinización y fecundación de los óvulos, el ovario inicia su crecimiento en grosor y

longitud hasta quedar convertido en un fruto dehiscente (Figura 3), lo que significa que en la maduración (cuando su color cambia de verde a amarillo) se abre por sus costillas y a través de dicha abertura libera las semillas.

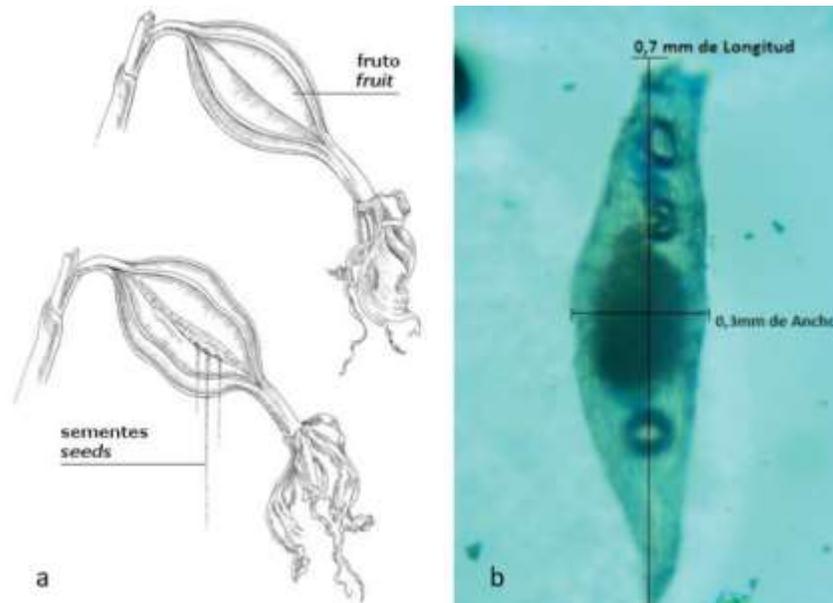


Figura 3. Morfología del fruto y semilla de orquídeas. a) Fruto (Malena Barreto, 1997); b) semilla y embrión de *Prosthechea* sp. (Banda-Sánchez *et al.*, 2017).

Sus formas también son muy variadas, según las especies. La maduración depende de la especie (entre 4 y 12 meses) (Menchaca *et al.*, 2011). De acuerdo con el estudio realizado por Cetzal-Ix *et al.* (2014) los frutos de *P. vitellina* miden 3.3 x 1.59 cm y se desarrollan en promedio dos frutos por planta.

Semillas: son variables en forma y tamaño, desde tipos filiformes, con más de 5 mm a semillas muy pequeñas, oblongas o subglobosas con menos de 0,1 mm de longitud. Para la germinación de las semillas en su entorno natural es necesaria una asociación fúngica ya que carecen de endosperma y no pueden nutrirse por sí mismas en esta primera etapa (Cabral, 2010). En un estudio sobre las características físicas y germinativas de *Prosthechea* sp., Banda-Sánchez *et al.* (2017) reportaron semillas con dimensiones de 0.7 mm de largo y 0.3 mm de ancho, con un tamaño de embrión de 0.3 mm de largo x 0.2 mm de ancho (Figura 3).

3.1.2 Ecología

La familia botánica Orchidaceae es una de las que mayor número de especies posee en el reino vegetal, con cerca de 27,135 en todo el mundo y 900 géneros (Zotz, 2013). La República Mexicana es una de las zonas florísticas más diversas del mundo, constituye el puente continental entre Norte y Sudamérica, por su gran variedad fisiográfica y climática. Se estima que la flora orquideológica de México comprende más de 1,200 especies y subespecies, distribuidas en 164 géneros (Soto-Arenas *et al.*, 2007). Una característica sobresaliente es el alto grado de endemismos, ya que se han registrado 444 especies o sub especies endémicas que corresponden aproximadamente a 40 % del total de *taxa* registrados en el país (Soto-Arenas, 1996). De acuerdo con la norma oficial vigente NOM-059-2010 (SEMARNAT, 2010), 181 especies se encuentran en alguna categoría de riesgo y 74 de ellas se consideran amenazadas o en peligro de extinción.

En México las orquídeas, junto con otros *taxa* de Bromeliaceae y Araceae, son un elemento fisonómica y ecológicamente importante (Espejo, 2012). Existen 151 áreas protegidas por el gobierno (Solano-Gomez *et al.*, 2008) y los estados de Michoacán, Jalisco, Oaxaca, Chiapas y Veracruz albergan el mayor número de especies de orquídeas.

3.1.2 Taxonomía

La clasificación taxonómica de las orquídeas es la siguiente (Hágsater *et al.*, 2005; Thorpe y Yeung, 2011):

Reino: Vegetal

Subreino: Embriophitas

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Orchidales

Familia: Orchidaceae

Género: 750 géneros estimados

Especie: entre 25,000 y 30,000 especies

En la actualidad se conocen cinco linajes principales dentro de las orquídeas, consideradas de manera formal como subfamilias (Chase *et al.*, 2003). De acuerdo con su orden de aparición en el árbol evolutivo de la familia, estas son: Apostasioides, Vanilloides, Cyripedioides, Orchidoides y Epidendroides. Recientemente se estableció que las orquídeas forman parte de un grupo mayor, el orden Asparagales dentro de las Monocotiledóneas.

3.1.3 Importancia económica

Las orquídeas representan un valor comercial que paulatinamente se han convertido en una actividad económica importante. Actualmente el Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINAREFI) a través de la Red Orquídeas coordina oportunidades de aprovechamiento que sean complementarias de otras actividades productivas convencionales, como la agricultura, la ganadería o la silvicultura. Con la finalidad de estudiar, conservar y aprovechar este recurso.

3.2 Generalidades de *Prosthechea vitellina* (Lindley)

3.2.1 Descripción botánica

Las plantas son hierbas epífitas de hasta 40 cm de altura. Las raíces son blanquecinas, de 1-3 mm de grosor. Los pseudobulbos están agrupados, cónico-ovoides, ligeramente comprimidos, verdes, glaucos cuando jóvenes, frecuentemente negruzcos con el tiempo, de 2-6 x 1-4 cm. Las hojas son de 1 a 3, agrupadas hacia el ápice del pseudobulbo, subcoriáceas, angostamente elípticas a oblanceoladas, obtusas, con la vena media prominente en el envés, de 7-25 x 1-3.6 cm. La inflorescencia es apical, racemosa, en ocasiones ramificada, de hasta 30 cm de largo, con 4-20 (-30) flores simultáneas; pedúnculo terete, envuelto en la base por una bráctea espatácea, escariosa, conduplicada, triangular-lanceolada, aguda, de 10-60 mm de largo, más arriba con varias

brácteas abrazadoras, herbáceas, ampliamente ovadas a triangular-ovadas, obtusas a agudas, de 6-10 mm de largo. Brácteas florales herbáceas ovadas a lanceoladas, agudas a acuminadas, de 4-10 mm de largo.

Flores vistosas, algo carnosas, de 3-4 cm de diámetro, muy abiertas, casi planas, resupinadas, inodoras, los sépalos y pétalos de color anaranjado a rojo-naranja, el labelo y la columna de color amarillo o anaranjado muy pálido, la antera rojo-naranja. Ovario delgado, recto o frecuentemente geniculado, abruptamente engrosado en el tercio apical, de 10-25 mm de largo y unos 3 mm de grosor en el ápice. Sépalos angostamente elípticos a elíptico-lanceolados, agudos a acuminados, con márgenes ligeramente revolutos; el dorsal ligeramente guillado, los laterales ligeramente oblicuos, prominentemente quillados dorsalmente sobre todo cerca del ápice, de 14-30 x 3-10 mm. Pétalos ampliamente elípticos, agudos, el ápice recurvado, de 13-28 x 6-15 mm. Labelo entero, cortamente unido a la base de la columna, prolongado adelante en 3-quillas cortas, la mitad apical convexa, con márgenes algo recurvados y el ápice obtuso a agudo, de 11.5-20 x 3.5-6 mm. Columna recta, semiterete, con un nectario ligeramente excavado en la superficie ventral en la zona unida con el labelo, el ápice terminado en 3 dientes, los laterales oblicuamente triangulares, agudos, el diente medio subcuadrado, truncado, ocultando parcialmente la antera y una pequeña lígula trapezoide; de 6-10 mm de largo y 4 mm de ancho en el ápice. Antera 4-locular, de 1.5 x 2.5 mm. Polinario compuesto por 4 polinios obovoides, lateralmente comprimidos, amarillo-cafes, unidos a caudículas granuladas. Rostelo pequeño, semicircular, con una secreción viscosa y adhesiva en la superficie ventral. Cavidad estigmática en forma de "V", cóncava. Cápsula elipsoide, 3-angulada, de 30 x 15 mm (Dressler y Pollard, 1974; Hamer, 1974) (Figuras 4 y 5).



Figura 4. Flor y ejemplar en floración de *Prosthechea vitellina* en hábitat natural.

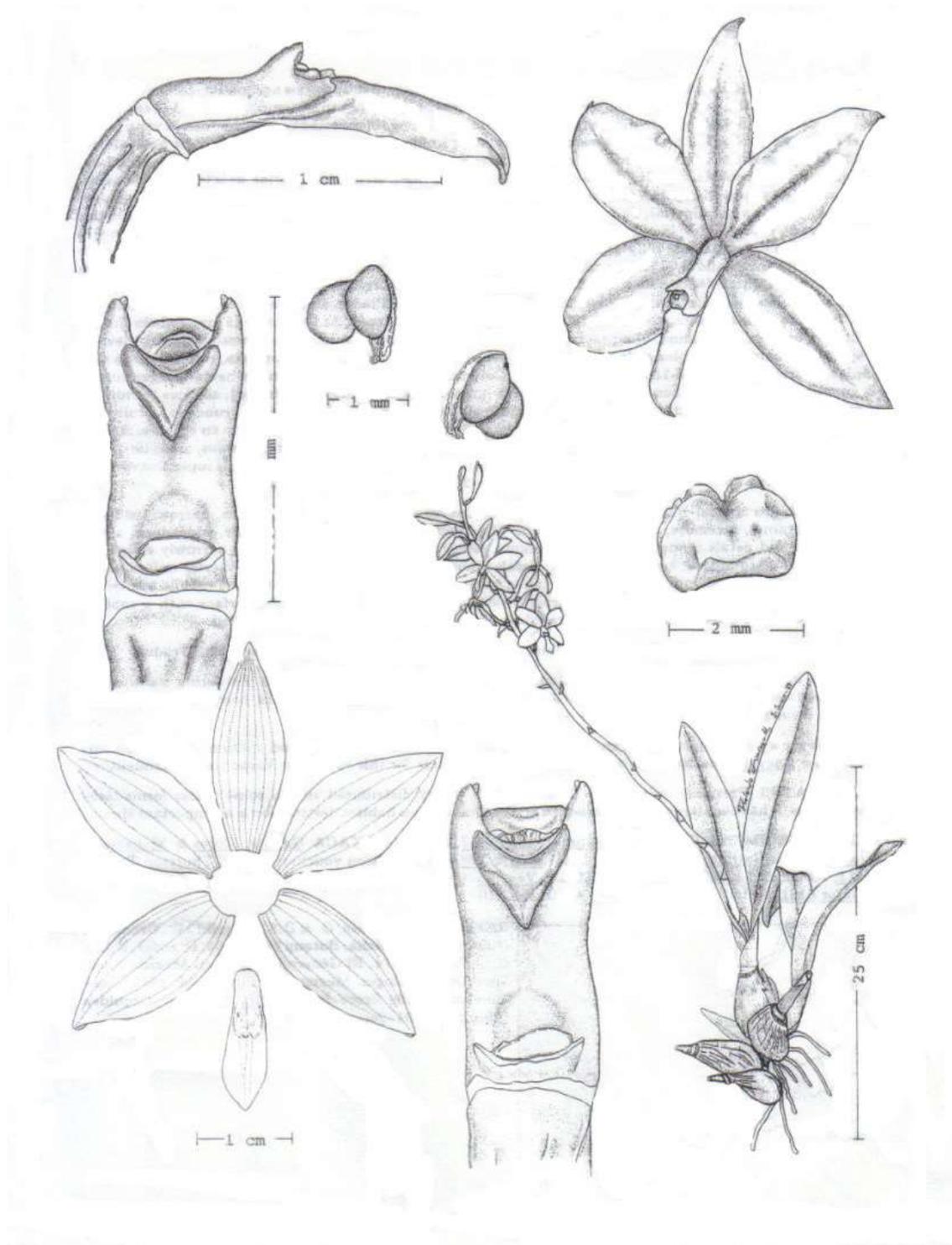


Figura 5. Lámina descriptiva de *Prosthechea vitellina* (Téllez, 2011).

3.2.2 Importancia del género

El género *Prosthechea* se re-estableció por W.E. Higgins en 1997, aunque algunas especies más tarde se trasladaron a *Euchile* (por ejemplo, *E. mariae* y *E. citrina*) (Withner, 1998). Anteriormente, la especie *vitellina* había sido incluida en diferentes géneros: *Anacheilium*, *Encyclia*, *Epidendrum*, *Euchile*, *Hormidium* y *Pollardia*. La condición de género fue confirmada por los datos recientes, sobre la base de pruebas moleculares (García-Cruz *et al.*, 2003). Así mismo, dentro del género se incluyen 112 especies de las cuales en México se encuentran *P. cochleata*, *P. concolor*, *P. cretacea*, *P. linkiana*, *P. livida*, *P. michuacana*, *P. pastoris*, *P. radiata* y *P. varicosa*. Las especies tienen amplia distribución en los estados de Michoacán, Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz, Querétaro, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Campeche y Quintana Roo.

De acuerdo con lo reportado por CONABIO (2010), *P. vitellina* fue descrita en 1831 por John Lindley a partir de ejemplares colectados en México, desde entonces ha sido una de las orquídeas mexicanas más ampliamente conocidas y cultivadas, tanto en México como en el extranjero. Menchaca *et al.* (2012), mencionan que *P. vitellina* tiene una amplia distribución en los estados de Puebla, Oaxaca, Chiapas y Veracruz y en algunos bosques de pino esta especie llega a ser una de las epifitas de mayor dominancia en términos de abundancia. A pesar de su distribución, la especie ha sido extraída intensamente para satisfacer la demanda hortícola y por ello se considera en riesgo.

3.3 Cultivo de orquídeas

3.3.1 Requerimientos del cultivo

Debido a que la mayoría de las orquídeas son epífitas (sus raíces no crecen bajo el suelo), para el desarrollo de las plantas es necesario reunir las condiciones óptimas de luz, riego, ventilación, temperatura y fertilización (Martija, 2007).

Luz: La mayoría de las orquídeas necesitan luz brillante (Behar y Tinschert, 1998) de forma indirecta para alcanzar la floración; si la luz es débil puede tardar en florecer o no hacerlo. Cuando la planta se encuentra en floración, nunca se debe exponer a los rayos directos del sol, ni siquiera a través de un cristal (ventana o domo). Algunas orquídeas

toleran la luz directa del sol, pero sólo en otoño e invierno, cuando es más débil su intensidad y otras sólo en invierno. La luz es el factor crucial que determina si la orquídea florecerá o no. Se necesita una cantidad adecuada de luz para asegurar un buen desarrollo de la planta y una buena acumulación de nutrientes. Si no se encuentra en un ambiente con la luz indispensable, entonces no podrá producir alimentos suficientes (azúcares) para ser utilizados en un ciclo de floración. Si tiene demasiada luz solar será quemada y desecada por la excesiva transpiración (Avila y Salgado-Garciglia, 2013).

Riego: Aunque las orquídeas no necesitan un riego directo, sí requieren que el ambiente esté húmedo. Es recomendable colocar las plantas en un ambiente húmedo o aplicar riegos cada tercer o cuarto día (Imes, 2000; Martija, 2007).

Ventilación: Las orquídeas, como muchas plantas necesitan estar en sitios con ventilación adecuada. La ventilación mediante cierres o rejillas de ventilación holgadas reduce la humedad relativa, lo que conduce a un aumento de la transpiración de la planta y al desarrollo de estomas funcionales para controlar la pérdida de agua de la planta (Seelye *et al.*, 2003).

Temperatura: Las orquídeas son especies que crecen en ambientes fríos templados y cálidos, pero la mayoría se desarrolla principalmente en ecosistemas tropicales, aunque algunas soportan climas extremos como heladas, altas temperaturas y precipitación. Las condiciones climáticas para su cultivo deben ser similares, por ello es importante conocer su origen o procedencia. Normalmente, la temperatura interior de las casas es adecuada para cultivar los tipos más comunes de orquídeas. Si la temperatura es confortable para el ser humano, lo será para las orquídeas; sin embargo, muchas orquídeas se pueden adaptar a condiciones desfavorables (Martija, 2007).

Fertilización: En su ambiente natural, las orquídeas se nutren de la materia orgánica en descomposición. Para su cultivo fuera de su hábitat es necesario proporcionar los nutrientes esenciales de forma constante y diluidos en dosis bajas para que sobrevivan (Suarez, 2007; Martija, 2007).

3.3.2 Plagas y enfermedades

Las enfermedades más comunes se diferencian por el agente causal, sin embargo, pueden presentarse conjuntamente si hay las condiciones propicias. Los hongos y bacterias pueden afectar simultáneamente si hay exceso de humedad o mala ventilación. Además, la presencia de ciertos insectos (pulgones) puede facilitar la diseminación de los hongos (Röllke, 2008).

3.3.3 Propagación sexual

Al igual que la mayoría de las plantas, las orquídeas se reproducen de forma sexual y asexual. En la naturaleza la vía sexual es resultado de la polinización cruzada, hay intercambio genético y la descendencia adquiere genes de ambos progenitores, lo que garantiza mayor diversidad en las características de la descendencia (Castellanos *et al.* 2006).

La mayoría de las semillas de las orquídeas necesitan de un hongo específico para germinar, la simbiosis ayuda a alimentar a las semillas mientras se desarrollan sus hojas y raíces (Menchaca y Moreno, 2011). En la naturaleza, el éxito de este proceso es limitado porque deben coincidir muchos factores simultáneamente, por lo que el porcentaje de germinación es menor de 1%. Se ha estimado que sólo 10 o 15 semillas llegan a germinar de un total de 1 millón (0.001%), y sólo una o dos alcanzan el estado adulto después de dos o tres años.

Las semillas de orquídeas que germinan en un medio natural, lo hacen necesariamente en simbiosis con hongos micorrízicos y se conoce como germinación simbiótica. Las semillas son microscópicas y contienen escasas o nulas reservas para llevar a cabo su germinación, adicionalmente presentan pequeñas cantidades de lípidos y proteínas como material de reserva y no presentan endospermo y cotiledones. Es por ello, que estratégicamente establecen una relación simbiótica con micorrizas, especialmente basidiomicetos, entre ellos *Rhizoctonia sp.*, *Tulasnella sp.* y *Epulorhiza sp.* (Yuan *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2015) en la que, después de la infección se establece un flujo de carbohidratos, minerales, vitaminas, hormonas y aminoácidos que contribuyen a la

germinación de semillas y desarrollo de las plantas. Las plántulas de orquídeas epífitas también pueden utilizar la simbiosis con hongos como una fuente de resistencia a la desecación, resultado de su pequeño tamaño y hábito arbóreo (Yoder *et al.* 2000; Weber y Webster, 2001; Mayo *et al.* 2010).

Otra forma de propagar las orquídeas es la germinación asimbiótica, que es cuando una semilla puede germinar y desarrollarse sin la presencia del hongo. Este procedimiento normalmente ocupa condiciones *in vitro* (Menchaca y Moreno, 2011) o mediante el co-cultivo de las semillas con diversos hongos micorrízicos para establecer la relación simbiótica. En esta última vía es necesario el aislamiento y cultivo del hongo en un medio de cultivo específico (Mayo *et al.*, 2010). Sin embargo, puede afectar la germinación porque tanto la orquídea como el hongo tienen requerimientos de medios de cultivo diferentes.

3.3.4 Propagación asexual

La propagación asexual se obtiene de cualquier parte de la planta madre como pueden ser rizomas, brotes generados del tallo o pseudobulbos (Mayo *et al.*, 2010). Algunas ventajas de la reproducción asexual incluyen la obtención de plantas de calidad en mayor cantidad y en menor tiempo y hacerlo en cualquier época del año, lo que permite mayor eficiencia en el ciclo del cultivo y favorece que la floración se produzca más de una vez por año (Martija, 2007).

La separación de pseudobulbos es una de las maneras más comunes de propagación asexual de orquídeas, es viable cuando la planta forma gran cantidad de pseudobulbos, los que se pueden separar para obtener una nueva planta. Otra forma de obtener nuevas plantas es cortar los pseudobulbos en la planta madre para inducir la formación de brotes. Otro método utilizado es la propagación por hijuelos o *Keiki*, derivado del vocablo Hawaiano que significa *bebé*, y que los cultivadores de orquídeas utilizan para referirse a *hijuelos* que nacen en diferentes partes de las plantas; esta técnica consiste en separar los hijuelos una vez que se puedan desprender de la planta madre (Menchaca y Moreno, 2011).

La reproducción asexual de plantas por cultivo de tejidos es posible gracias a que, en general, las células de un individuo vegetal poseen la capacidad necesaria para permitir el crecimiento y el desarrollo de un nuevo individuo, sin que medie ningún tipo de fusión de células sexuales o gametos (Bouharmont, 1994; Predieri, 2001).

El cultivo de tejidos vegetales representa un gran avance para la propagación de orquídeas. Esta técnica ha sido aceptada como un método alternativo potencial para la propagación y conservación a gran escala de orquídeas amenazadas y en peligro de extinción. La invención de la técnica de propagación *in vitro* ha salvado a muchas orquídeas que crecen naturalmente y su colección de la naturaleza se ha reducido (Pant, 2013). La creciente popularidad de las orquídeas para flor cortada y con fines medicinales ha agregado una nueva dimensión a la técnica de propagación *in vitro* a través de la cual se puede obtener un número significativo de clones idénticos (Pongener y Deb, 2012). Por lo tanto, los métodos para la multiplicación rápida de orquídeas son esenciales para satisfacer la demanda comercial y contribuir a su conservación.

3.4 Cultivo de tejidos vegetales *in vitro*

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* tiene sus orígenes en los trabajos de Morel (1960) sobre la propagación de orquídeas y también en el desarrollo del medio de cultivo MS propuesto por Murashige y Skoog (1962). Desde entonces el cultivo de tejidos se ha desarrollado ampliamente y es clave en la propagación de especies, mejoramiento genético e ingeniería genética. El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es un conjunto de técnicas donde se aísla asépticamente un explante y se cultiva en condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido (Osuna y Saucedo, 2010). Engloba el cultivo de protoplastos, células, tejidos y órganos, teniendo en común el cultivo de material libre de contaminantes en un medio ambiente aséptico y controlado (Thorpe, 2007).

El término *in vitro* es el cultivo dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial con dos peculiaridades: la asepsia y el control de los factores que afectan el crecimiento (Sharry, 2015). Esta técnica de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* permite obtener una

gran cantidad de plántulas a partir de un explante, además, las plantas obtenidas son genéticamente idénticas a la planta madre (clones) (Rangel *et al.*, 2016).

Las orquídeas fueron las primeras plantas que se propagaron por cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, seguido de plantas de follaje (*Ficus*, *Dracaena* etc.) y de plantas ornamentales como *Saintpaulia* (Miller y Murashige 1976; Chandler y Lu, 2005). En la actualidad las aplicaciones del cultivo de tejidos abarcan mucho más que la propagación clonal y micropropagación. Las tecnologías empleadas se han expandido hasta emplear a la embriogénesis somática en bioreactores para la propagación masiva. La aplicación de estas tecnologías posee un amplio rango, desde mejoramiento genético hasta biología molecular y bioprocesos (Rout *et al.*, 2006).

Actualmente la micropropagación es una tecnología utilizada para muchas especies que se propagan con diferentes fines. Entre los cultivos más propagados a gran escala se encuentran el plátanos, café, papaya y caña de azúcar (Kumar *et al.*, 2006).

3.4.1 Totipotencia celular

Haberlandt en 1902 propuso la teoría de que todas las células vegetales tienen la capacidad de regenerar plantas completas; no demostró su hipótesis porque no pudo lograr la división celular, ya que los medios de cultivo que empleaba no incluían reguladores del crecimiento, hasta ese momento desconocidos (Echenique *et al.*, 2010). La totipotencia es un indicador de que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Calva y Pérez, 2005).

La totipotencia celular se define como la capacidad genética que poseen las células somáticas de regenerar una planta completa cuando se proporcionan las condiciones adecuadas. Así, las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo con la competencia que posea y al estímulo que reciban (Radice, 2010). En otra definición, la totipotencia es la capacidad que poseen las células somáticas de ser competentes para la regeneración de brotes en conjunto con

algunos otros factores como la alta vascularidad y niveles de fitohormonas y metabolitos (Castellanos *et al.*, 2006). También se define como la capacidad de las células vegetales para desdiferenciarse y diferenciarse de nuevo bajo determinados estímulos (Gisbert, 2011).

3.4.2 Morfogénesis *in vitro*

La morfogénesis se refiere a las alteraciones morfológicas de un organismo que suceden como resultado de cambios estructurales o de organización durante su desarrollo (Villarreal, 2015). Es un proceso biológico altamente controlado que es crucial para que los organismos desarrollen células y órganos de una forma particular, el proceso de morfogénesis es, en sí mismo, un fenómeno físico que implica cambios en las características geométricas de células y órganos (Sampathkumar, 2020). La embriogénesis somática y la organogénesis son dos procesos morfogénicos mediante los cuales se pueden regenerar plantas completas usando el cultivo *in vitro* (Figura 6). Bajo estas condiciones las células somáticas pueden regenerar embriones o brotes, raíces y/o flores. La regeneración es un proceso que comprende diferentes fases que se suceden de manera similar en la embriogénesis somática y la organogénesis (Radice, 2010).

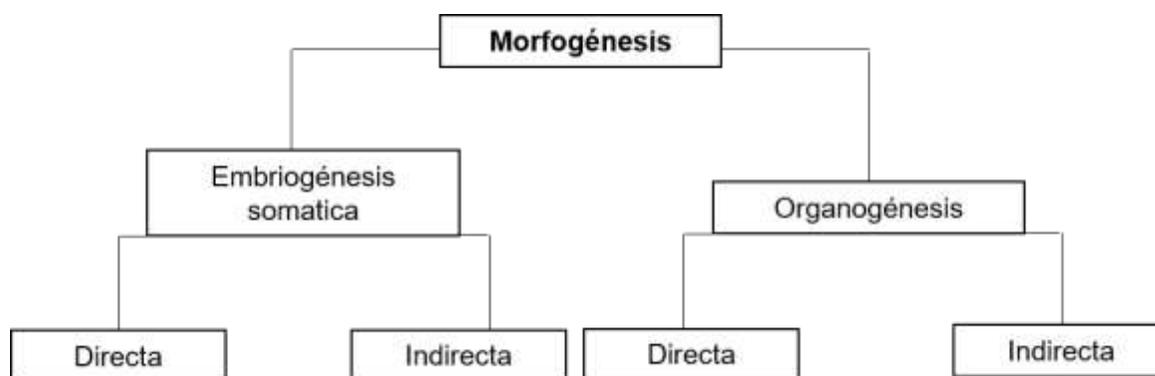


Figura 6. Esquema de las diferentes rutas morfogénicas.

La morfogénesis se define como la formación o la génesis de órganos y comprende el crecimiento y diferenciación celular. En la organogénesis se produce la formación de

tallos, raíces u otras estructuras y en la embriogénesis somática se forman embriones que al germinar dan lugar a una planta. En ambos casos, el proceso se genera a partir de células somáticas. Si la respuesta primaria al estímulo morfogénico es la formación de callo antes de diferenciarse meristemos o embriones se habla de organogénesis o embriogénesis indirecta (Gisbert, 2011). El desarrollo vascular es la base de cada proceso de organogénesis y morfogénesis para garantizar la entrega de recursos y el soporte mecánico a cualquier tejido y órgano (Frugis, 2019).

Calva y Pérez (2005) mencionan que en micropropagación, la embriogénesis y la organogénesis (Figura 7) pueden usarse para obtener clones somáticos y regenerar plantas completas, con características uniformes y libres de microorganismos, de genotipos élite y especies difíciles de propagar por métodos convencionales.

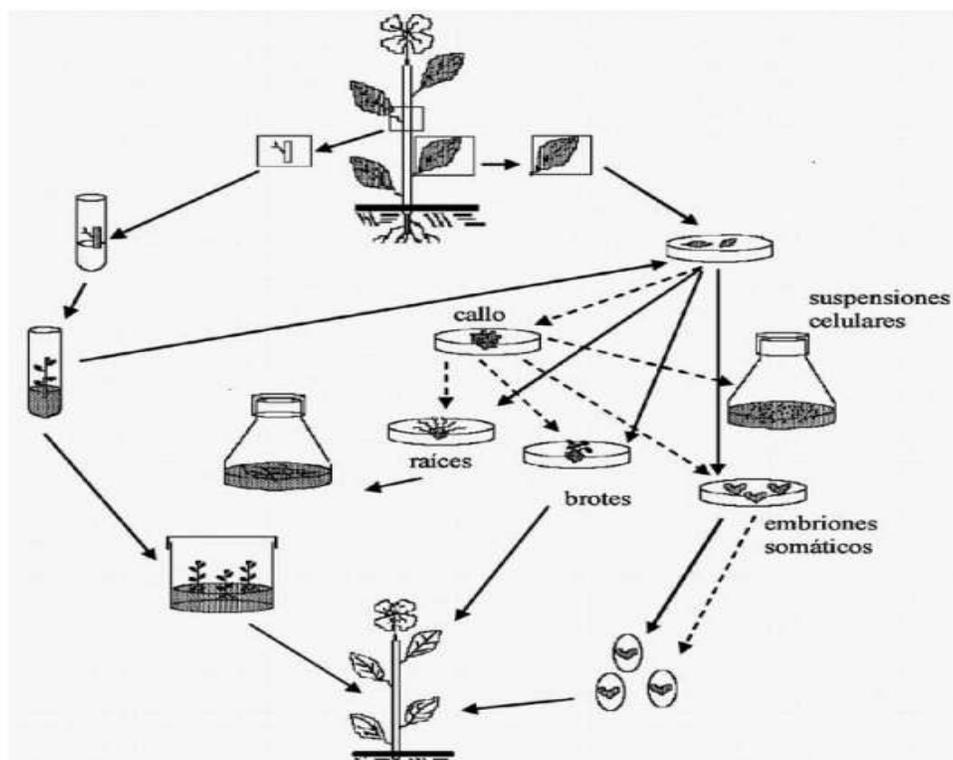


Figura 7. Esquema de los diferentes procesos morfogénicos obtenidos a partir de la siembra *in vitro* de diferentes explantes. Las líneas continuas expresan organogénesis o embriogénesis directa mientras que las líneas quebradas indican que la morfogénesis se obtiene por vía indirecta (Calva y Pérez, 2005).

3.4.3 Organogénesis *in vitro*

La organogénesis es la capacidad de los tejidos vegetales para formar varios órganos de novo. El proceso de organogénesis proporciona la base para la propagación asexual de plantas en gran parte a partir de tejidos somáticos no meristemáticos (Schwarz y Beaty, 2018). La organogénesis constituye la característica biológica que impulsa la regeneración *in vitro* de las plantas, en la que el papel de las hormonas vegetales es crucial (García-Pérez *et al.*, 2020). Es una característica muy compleja que aprovecha la totipotencia de las células vegetales para formar nuevos órganos con la capacidad de convertirse en plántulas funcionales, en condiciones específicas (Bhatia y Bera, 2015).

La organogénesis puede llevarse a cabo de forma indirecta o directa; la primera se genera a partir de un callo, el cual, es una masa amorfa que pierde su arreglo parenquimático y continúa la proliferación celular del explante. La directa se origina por la formación de brotes a partir de los explantes sin que se presente la formación de callo (Iliev *et al.*, 2010; Olmos *et al.*, 2010). La organogénesis indirecta a menudo induce la variación somaclonal y permite exponer características diferentes que no están expresadas normalmente en la naturaleza o bien eliminar alguna indeseable y que a partir del callo formado se obtienen tejidos diferenciados como un trozo de raíz, tallo u hoja (Perianez-Rodríguez *et al.*, 2014).

Calva y Pérez (2005) hacen referencia a que el cultivo de órganos se puede rediferenciar hasta plantas completas que luego se transfieren a invernadero. Gisbert (2011) menciona que para inducir la organogénesis en los diferentes tipos de explantes se pueden utilizar distintos reguladores de crecimiento, de tipo auxina combinados con citocininas, y hace hincapié en que cada caso requiere de reguladores en concentraciones determinadas, basadas en los objetivos que se quieran alcanzar.

3.4.4 Embriogénesis somática

La embriogénesis somática se define como un proceso en el que se forman estructuras similares a embriones a partir de tejidos somáticos y se convierten en una planta completa. La embriogénesis somática es una vía de regeneración útil para muchas

monocotiledóneas y dicotiledóneas. En este proceso, la composición del medio de cultivo controla todo el proceso (Gisbert, 2011; Bhatia *et al.*, 2015).

La embriogénesis somática se puede establecer de forma indirecta, donde el explante primero forma un callo, o directa, donde los embriones se forman directamente del explante (Villarreal, 2015). De acuerdo con Rodríguez *et al.* (2014) la formación de callo es la vía indirecta de la embriogénesis y el cultivo de callos puede ser utilizado para diferentes propósitos, tales como la micropropagación y el mejoramiento vegetal.

Para inducir la embriogénesis se suelen utilizar auxinas y en concreto el 2-4 D (ácido 2-4 diclorofenoxiacético) (Gisbert, 2011).

3.5 Factores que afectan los procesos morfogénicos *in vitro*

3.5.1 El genotipo

El genotipo es un factor determinante en todos los procesos morfogénicos, desde la capacidad del explante para su establecimiento en condiciones *in vitro* a la proliferación de callo, o la diferenciación y crecimiento de nuevos órganos (Castellanos *et al.* 2006; Rodríguez *et al.* 2014). Por esta causa, no es posible generalizar metodologías o protocolos de trabajo debido a que los medios de cultivo, así como las condiciones de cultivo seleccionados, deben ser específicos para cada situación en particular. Algunos genotipos no responden al cultivo *in vitro* o son recalcitrantes, mientras que otros, responden para producir callos o brotes con facilidad (Smith, 2013; Mahmood y Razzaq, 2017).

3.5.2 El explante

Los procesos morfogénicos dependen del genotipo, pero a esto debe sumarse el efecto del explante seleccionado. El tratamiento de la planta madre, las condiciones físicas y fisiológicas en las que ésta se encuentre y el sector del cual se tome el explante determinarán a su vez la respuesta morfogénica en condiciones *in vitro* (Molina *et al.*, 2002; Radice, 2010).

Las plantas jóvenes o en desarrollo con tejidos meristemáticos y crecimiento vegetativo vigoroso son la mejor fuente de explantes (Calva y Pérez, 2005; Smith, 2013). De la misma manera manifiestan que, aunque en una misma planta se puede encontrar tanto crecimiento juvenil como adulto, el primero se caracteriza por ser activo y por la ausencia de estructuras reproductoras, mientras que el adulto es más lento y presenta estructuras sexuales para la reproducción de la planta. Además, las plantas adultas pueden haber acumulado mayor cantidad de microorganismos en sus tejidos y contener menos células meristemáticas, necesarias para establecer los cultivos *in vitro*.

Cualquier parte de la planta puede usarse como un explante (Smith, 2013). Si la propagación clonal es el objetivo, entonces el explante usualmente será una yema, brote lateral o terminal (Cancino-Escalante *et al.*, 2015). También se utilizan yemas adventicias cuadradas de hojas pequeñas, yemas adventicias con discos de tallo, microtubérculos y yemas de rizoma (Wang *et al.*, 2021).

3.5.3 Medio de cultivo

Un medio de cultivo consta de sales inorgánicas, vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento. Existen diferentes tipos de medios de cultivo disponibles; sin embargo, algunos son específicos para ciertas especies. Se han descrito un gran número de medios para el cultivo de vegetales *in vitro* (Calevo *et al.*, 2017). El éxito con el cultivo de tejidos vegetales depende del uso del medio adecuado y del empleo de tejidos viables, incubación, calidad de reactivos, asepsia, entre otros.

Los componentes principales del medio son: macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azúcares, agentes gelificantes y hormonas o reguladores de crecimiento (Perea y Tirado, 2011).

Los macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg y S) proveen los elementos indispensables para el desarrollo de las plantas y constituyen al menos el 0.1 % del peso de materia seca de las plantas. Por lo que el éxito en el cultivo de tejidos dependerá de la selección de macronutrientes en la concentración y balance adecuados (Razdan, 2003; Trejo y Alcantar, 2010).

Los micronutrientes (Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, Br, Co, Ni) son requeridos en pequeñas cantidades para el desarrollo de las plantas y actúan como cofactores e inductores de la síntesis de enzimas (Gamborg, 2002, Trejo-Tellez y Alcantar, 2010).

Los medios más empleados para el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* son: medio LS (Linsmaier y Skoog, 1965); medio B5 (Gamborg *et al.*, 1968); medio MS (Murashige y Skoog, 1962).

3.5.4 Reguladores de crecimiento vegetal

El uso apropiado de reguladores de crecimiento vegetal definirá el éxito de la morfogénesis. En condiciones óptimas de cultivo pueden aumentar significativamente la diferenciación de órganos (Torre, 2017). Una hormona vegetal o fitohormona es un compuesto producido internamente por una planta, que ejerce su función en muy bajas concentraciones y cuyo principal efecto se produce a nivel celular, cambiando los patrones de crecimiento de los vegetales y permitiendo su control (Alcantara-Cortes *et al.*, 2019).

Las auxinas son hormonas que participan durante todo el ciclo de vida de las plantas y son particularmente interesantes ya que se distribuyen diferencialmente dentro de los tejidos lo que da lugar a diferentes procesos morfogénicos (Garay-Arroyo *et al.*, 2014); promueven la elongación celular, la formación de callos y raíces adventicias, mientras que las citocininas: promueven la división celular, regulan el crecimiento y el desarrollo de los tejidos vegetales (Segretin, 2011). De acuerdo con Alcantara-Cortes *et al.*, (2019) las principales fitohormonas más conocidas en la aplicación biotecnológica son auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico, ácido salicílico, poliaminas, jasmonatos y derivados, brasinoesteroides, etileno y estrigolactonas.

La primera fitohormona aislada fue la auxina ácido indol-3-acético (IAA). Las auxinas sintéticas usadas más frecuentemente son el ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 3-indol butírico (IBA) y el ácido 1-naftalenacético (ANA) (Gamborg, 2002; George *et al.*, 2008) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Auxinas comúnmente usadas en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* (Gamborg, 2002).

Nombre químico	Abreviatura
Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético	2,4-D
Ácido 2,4,5-Triclorofenoxiacético	2,4,5-T
Ácido 2-metoxi-3,6-diclorobenzoico	Dicamba
Ácido indol-3-ácetico	AIA
Ácido indol-3-butirico	IBA
Ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético	MCPA
Ácido 1-naftalenacético	ANA
Ácido 4-amino-2,5,6-tricloropicolínico	Picloram

Las citocininas tienen la capacidad de estimular e inducir una alta proliferación y división celular, suelen inducir la iniciación y elongación de las raíces al igual que pueden activar la senescencia de las hojas, permitiendo estimular el desarrollo fotomorfogénico vegetal y jugar un rol importante en el aumento y generación de la producción de brotes a nivel vegetal (Salazar *et al.*, 2018; Alcantara-Cortes *et al.*, 2019). Al promover la división celular conduce a la regeneración *in vitro* de brotes, mediante la estimulación de la formación de meristemo apical de brote y subsecuentemente, yemas de brote (Radice, 2010; Gupta, 2013).

La primera citocinina aislada fue la cinetina (kin) y en la actualidad es común utilizar citocininas sintéticas como el 6-benziladenina (BA) y el tidiazurón (TDZ) (Tian *et al.*, 2017) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Citocininas comúnmente utilizadas en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*

Nombre químico	Abreviatura
6-benziladenina ó 6-benzilaminopurina	BA ó BAP
N ⁶ - (2-isopentil) adenina	2IP
6-furfurilaminopurina	Kin
1-fenil-3-(1,2,3-tidiazol-5-yl)urea	Tidiazurón ó TDZ
4-hidroxi-3-metil-trans-2-butelinaminopurina	Zeatina

3.5.5 Antioxidantes y adsorbentes

El carbón activado en general se usa para adsorber compuestos tóxicos de la micro atmósfera gaseosa o el exceso de reguladores del crecimiento presentes en el medio de cultivo. La presencia de carbón activado presenta una relación positiva en la germinación y formación de los protocormos en especies de orquídeas como *Cymbidium giganteum* y *Cyrtopodium saintlegerianum* (Schneiders *et al.*, 2012; Rodrigues, 2015). Aunque se deben establecer protocolos adecuados para cada tipo de orquídea mediante pruebas específicas (Hossain *et al.*, 2010), Se le tribuye al carbón activado la propiedad de adsorber gran variedad de sustancias nocivas y gases tóxicos liberados al medio por las plantas y también durante el proceso de esterilización en autoclave (Sáenz *et al.* 2010).

3.5.6 Fuente de Carbono

La fuente de carbono es un componente importante en cualquier medio de cultivo y es esencial para el desarrollo *in vitro*. La fuente de carbono se necesita porque los explantes no son completamente autótrofos, y no pueden cubrir sus necesidades con la fotosíntesis que pueden realizar *in vitro* (Segretin, 2011; Rojas, 2016). Muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos y, por lo tanto, es necesario agregar al medio una fuente de carbono, sacarosa en concentraciones de 2 a 5% que actúa como fuente de energía. Generalmente se usa sacarosa ya que es fácilmente asimilable por las plantas, además de que es económica; También se pueden emplear otros carbohidratos tales como glucosa, maltosa, galactosa y sorbitol (Gamborg, 2002; Rojas, 2016).

3.5.7 Otros suplementos

Las vitaminas son uno de los principales suplementos adicionales para complementar el medio de cultivo; tienen funciones catalíticas en reacciones enzimáticas (Cruz, 2012). El uso de las vitaminas en los medios de cultivos es variable dependiendo de la especie, las que más se emplean son la Tiamina (B1) y la Piridoxina (B6) (Rojas, 2016). También se pueden añadir otras vitaminas tales como ácido nicotínico; B3, biotina; H, entre otras, porque pueden potencializar la respuesta morfogénica (Boeri, 2015).

3.6 Cultivo *in vitro* de Orquídeas

La propagación y cultivo *in vitro* de orquídeas inició con la germinación en el medio de cultivo de Knudson (1922) adicionado con sacarosa sin la asociación con hongos (Martija, 2007). Posteriormente, Knudson (1946) adicionó nutrientes para la germinación de semillas de orquídeas. A partir de este descubrimiento muchas orquídeas se han regenerado y propagado a partir de segmentos de hoja, segmentos nodales de plántulas provenientes de semillas germinadas *in vitro*, nudos florales, ápices, rizomas y microsecciones apicales (Murthy, 2001; Chen *et al.*, 2002).

El cultivo *in vitro* de orquídeas en medios nutritivos permite una producción rápida y uniforme de plántulas (Arditti y Krikorian, 1996; Stewart y Kane, 2006; Silva *et al.*, 2017). A través de la técnica de cultivo *in vitro* se pueden obtener un gran número de plantas, transformándose en una valiosa herramienta cuando se trata de propagar especies en peligro de extinción, híbridos desde el punto de vista comercial o del mantenimiento de la biodiversidad (Lallana *et al.*, 2020).

De acuerdo con Mayo *et al.* (2010) la primera propagación exitosa de orquídeas en condiciones *in vitro* a partir de la germinación de semillas fue lograda por Knudson (1922) con especies de *Cattleya* y otras especies como *Dendrobium tosaense* (Lo *et al.*, 2004) y *Cattleya aurantiaca*, *Encyclia chacoensis* y *Brassavola nodosa* (Damon *et al.*, 2004).

3.6.1 Medios de cultivo

Para la germinación de semillas de orquídeas se reportan algunos medios de uso generalizado como Knudson C (Knudson, 1946) y MS (Murashige y Skoog, 1962) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Formulación de medios de cultivo, empleados en el cultivo *in vitro* de orquídeas (Mayo *et al.* 2007).

Compuestos (mg L ⁻¹)	Murashige y Skoog (MS, 1962)	Knudson C (1946)	Vacint y Went (VW, 1949)	Lindemann (1970)	Dalla Rosa y Laneri (1977)
NH ₄ NO ₃	1650				
KNO ₃	1900		525		
CaCl ₂ 2H ₂ O	332.2				1000
MgSO ₄	370	250	122.1	58.62	250
KH ₂ PO ₄	170	250	250	135	250
(NH ₄) ₂ SO ₄		500	500	1000	500
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O		1000		347.2	
H ₃ BO ₃	6.2			1.014	
MnSO ₄ 4H ₂ O	22.3	5.682	5.68	0.05	7.5
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.6			0.565	
Na ₂ MoO ₄	0.25				
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.025			0.019	
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0.025				
KI	0.83			0.099	
FeSO ₄ , 7H ₂ O	27.85	25			27.85
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	37.27			1050	37.25
Tartrato férrico			28		
Fosfato de Calcio tribásico			200		
Cloruro de Níquel				0.03	
Citrato férrico				4.4	

Sin embargo, los requerimientos pueden ser muy diversos, incluso en especies del mismo género (Mayo *et al.* 2010). Existen numerosos medios para el cultivo de semillas de orquídeas, siendo los más usados Knudson (1946), Vacin & Went (1949) y Murashige & Skoog (1962). De los tres citados, el que mejor resultado ha dado para los géneros comunes ha sido el MS diluido al 50% manteniendo el nivel de sacarosa en 3% (Lallana *et al.*, 2020).

Gil *et al.* (2016) reportó para la germinación de *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl y *Maxillaria nutans* Lindl con el medio MS adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa y mio-inositol en concentración de 0.1 g L⁻¹, mientras que Rodríguez (2009) logró la germinación asimbiótica de orquídeas silvestres con el medio Knudson C, VW, y MS al 50% (1962).

También se sugiere que las semillas de orquídeas deben germinarse en medio MS que contenga 30 g L⁻¹ de sacarosa y solidificado con 7 g L⁻¹ de agar (Yam y Arditti, 2017).

3.6.2 Tipos de explantes

En la propagación *in vitro* de orquídeas se pueden utilizar distintos tipos de explantes, sin embargo, se prefieren los obtenidos de plántulas germinadas *in vitro* porque se tiene mayor control de las condiciones asépticas. El potencial de regeneración de explantes como yemas axilares, discos de tallo, segmentos de inflorescencia, tallos florales, hojas, cáscaras de hojas, órganos perennes (pseudobulbos, rizomas, tubérculos) y raíces se ha incrementado y también se ha aplicado con éxito (Vij *et al.*, 2004; Arditti, 2008, Kant *et al.*, 2016).

Se utilizaron semillas inmaduras de *Barkeria scandens* para establecer un protocolo de germinación aplicado a la conservación de la especie de manera exitosa (Arenas y Aguirre, 2012). Otros explantes utilizados de plántulas germinadas *in vitro* son los protocormos (Gil *et al.* 2016), segmentos de hojas, estructuras tipo protocormos y pseudobulbos. En *Barkeria whartonianana* y *B. scandens* se logró la regeneración de plantas a partir de secciones longitudinales de protocormos, y secciones de hoja y tallo, respectivamente (Villafuerte, 2013). Incluso se ha utilizado polen aglutinado en polinios para evaluar la germinación (Bonilla-Sanchez y Mosquera-Mosquera, 2019).

3.6.3 Reguladores de crecimiento

Diversos reguladores de crecimiento y diferentes combinaciones se han empleado en el cultivo *in vitro* de orquídeas tales como auxinas (ácido naftalenacético, ANA), citocininas (benciladenina, BA), giberelinas (ácido giberélico, GA₃), y ácido abscísico (ABA) en diferentes dosis. En la propagación *in vitro* de orquídeas mexicanas (*Cattleya aurantiaca*,

Encyclia adenocaula, *Euchile citrina*, *Epidendrum radicans*, *Laelia albida*, *Laelia autumnalis*, *Laelia speciosa*, *Oncidium tigrinum* y *Oncidium cavendishianum*) se usaron diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento (ANA/BA, ANA/GA₃, ANA/BA/GA₃) en dosis de 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 y 10 mg L⁻¹, con la finalidad de inducir callos y regenerar estructuras tipo protocormos y plántulas (Avila y Salgado-Garciglia, 2013). De este modo se observó que las dosis y combinaciones de reguladores de crecimiento para la proliferación y desarrollo de las estructuras protocórmicas fueron similares a los observados en la micropropagación de *Epidendrum longipetalum*, que en presencia de 2.5 mg L⁻¹ tanto de BA como de ANA se produjeron protocormos y brotes a los 40 días de cultivo de los explantes (Torres-Zúñiga y Aguirre-León, 2001).

Otras orquídeas requieren dosis mayores de reguladores, como en *Laelia anceps* Lindl., donde la combinación 1:1 de auxina/citocinina (ANA/BA) de 8 mg L⁻¹, dio como resultado el mayor número de estructuras protocórmicas hasta los 180 días del cultivo (Suárez *et al.*, 2011). En el caso de *Cymbidium aloifolium* se logró obtener un máximo de 9.6 brotes por explante con la combinación de 1.0 mg L⁻¹ de BA y 0.5 mg L⁻¹ de ANA (Paul *et al.*, 2019). Para determinar la inducción de brotes en *Phalaenopsis* spp. Se utilizó BA (20.2 µM) solo y combinado con ANA (5.37 µM) obteniendo 2.4 brotes por yema en la combinación BA/ANA en comparación con 2 brotes por yema utilizando solo BAP (Frausto *et al.*, 2019). Para la especie *Dendrobium chryseum* se obtuvo mayor enraizamiento y raíces más largas con la adición al medio de cultivo MS de 1.5 mg L⁻¹ de AIA (Maharjan, 2020).

3.6.4 Métodos asépticos

La desinfección del tejido fuente de explantes en el cultivo *in vitro* se realiza con agentes desinfectantes como hipoclorito de sodio o calcio. La penetración del agente desinfectante en superficies rugosas o vellosas del tejido vegetal se puede incrementar con la adición de agentes tensoactivos como el Tween 20 (Mayo *et al.* 2010).

Existen diversos métodos para la desinfección de las semillas de orquídeas, entre ellos están los siguientes: El de la jeringa consiste en tomar 5 mL y colocar un filtro de algodón

en la punta, envuelto de tela y amarrado con una liga. Posteriormente se inserta el émbolo para asegurarse de que no está completamente taponeado, después se saca el émbolo de la jeringa y se vierte una pequeña cantidad de semillas y se inserta nuevamente, luego se prepara una solución de cloro al 1% añadiendo una gota de detergente y se mojan las semillas completamente y por último se lavan las semillas de tres a cuatro veces con agua destilada.

Otro método es el de Paquete el cual consiste en usar sobres pequeños de papel filtro con cierta cantidad de semillas, doblarlos y sellarlos con grapas. Posteriormente sumergirlos en agua destilada por 10 min, apretando suavemente para eliminar las burbujas de aire, luego sumergir los sobres en solución de cloro al 1% con una gota de detergente durante 10 min, agitándolos suavemente. Después enjuagar los sobres con agua destilada cuatro veces (Menchaca y Moreno, 2011).

Para la desinfección superficial de capsulas inmaduras de *P. fragans* se realizó el siguiente protocolo: dos inmersiones en hipoclorito de sodio al 2.5% durante 5 minutos y enjuagues con abundante agua destilada desionizada estéril durante 2 minutos realizando la segunda parte en campana de flujo laminar (Salgado y Peñaranda, 2018).

También se ha utilizado hipoclorito de sodio al 0.5 % en un tiempo de inmersión de 85 min, el cual dio como resultado un porcentaje de germinación satisfactorio tanto para semillas con cubiertas relativamente permeables como *Anacamptis laxiflora* como para aquellas con cubiertas de semillas relativamente impermeables como *Himantoglossum robertianum* (Katsalirou *et al.*, 2019).

3.7 Cultivo *in vitro* del género *Prosthechea*

3.7.1 Medios de cultivo

Se han reportado investigaciones sobre la germinación *in vitro* de semillas de *Prosthechea fragans* (Sw.) W. E. Higgin en medios de cultivo conteniendo sales inorgánicas al 50% como Knudson (1946), Vacin y Went (1949), Murashige y Skoog (1962) y Morel (1960), sin embargo, en ninguno de los medios de cultivo probados se observó germinación (Rodríguez *et al.* 2007).

Por otro lado, Cazarez *et al.*, (2016) establecieron protocormos de *P. citrina* cultivados en medio Murashige y Skoog (MS, 1962) adicionado con combinaciones de BAP/ANA en concentraciones de 1.0–0.1 a 3.0-0.3 mg L⁻¹ para organogénesis y para enraizamiento la combinación ANA/BAP, en concentraciones de 1.0–0.1 a 3.0- 0.3 mg L⁻¹, la eficiencia observada en nuevos brotes fue de 6.75 por explante y la longitud máxima de hoja fue de 20.6 mm y la de raíces fue de 38.27 mm. En aclimatación se observó una supervivencia de 85%. Para la misma especie Cano (2013) cultivó las semillas en medio sólido Murashige y Skoog (MS,1962) al 50%, incubadas a 25 ±2 °C y fotoperiodo de 16/8 h de oscuridad con lámparas fluorescentes de 74 W. En una primera etapa se logró obtener la germinación de las semillas.

Para la germinación de semillas, crecimiento y desarrollo de protocormos se ha utilizado el medio MS (1962) suplementado con la composición de sacarosa 30 g L⁻¹, vitaminas Morel (1974), agua de coco al 10% (v/v), carbón activado 2 g L⁻¹ y 12 g L⁻¹ de agar; en especies de orquideas como *Cypripedium macrantho*, *Prosthechea fragans* y *Paphiopedilum spicerianum* (Ying Chena, 2015; Suh, 2016; Salgado y Peñaranda, 2018).

Para el caso de *P. vitellina*, Castelán *et al.* (2013) evaluó la germinación de las semillas en diferentes concentraciones de sales del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS, 1962), 100%, 75%, 50% y 25%. Los resultados obtenidos indicaron que el medio de cultivo MS (1962) a la concentración de 100% es el más adecuado para la germinación, después el de 25%, 75% y 50%, sin embargo, las plántulas tuvieron un mejor desarrollo en cuanto a tamaño, presencia de hojas y raíz en el medio de cultivo MS al 75%. Por lo cual llegó a la conclusión de que *Prosthechea vitellina*, es una especie que no necesita un medio de cultivo al 100% de su concentración original para germinar. Por otro lado, observo que el desarrollo de los protocormos fue notablemente mejor en el medio de cultivo con una concentración del 75%. Dicho autor concluye que es muy importante que al presentar un mejor desarrollo *in vitro* las plántulas tienen mayores probabilidades de sobrevivir al proceso de cultivo *ex vitro*. También se han cultivado semillas en medio semisólido MS sin reguladores de crecimiento obteniendo una tasa de germinación del 95.66 % (Jacome-Blasquez *et al.*, 2016).

3.7.2 Tipos de explantes utilizados *in vitro*

Se han empleado las semillas de *P. vitellina* como explante inicial con el objetivo de evaluar la capacidad germinativa *in vitro* (Castelán *et al.*, 2013) al igual que Jacome-Blasquez *et al.* (2016) con semillas de *P. vitellina*; del mismo modo Nava (2013) a partir de plantas madre y mediante polinización manual obtuvo las semillas de *P. citrina* para posteriormente cultivarlas en medio MS con 50 % de la concentración de sales, lo mismo para *P. fragans* (Rodríguez *et al.*, 2007), aunque no se observó respuesta germinativa. Cazares *et al.* (2016) reportaron para *P. citrina* el uso de protocormos para la obtención de plántulas *in vitro*.

3.7.3 Reguladores del crecimiento

Para *P. citrina* la organogénesis se obtuvo con la combinación de BA/ANA en concentraciones de 1.0–0.1 a 3.0-0.3 mg L⁻¹ (Cazarez *et al.*, 2016) y para enraizamiento la combinación ANA/BAP, en concentraciones de 1.0–0.1 a 3.0- 0.3 mg L⁻¹, como resultado en la fase de organogénesis observó que al agregar BAP al medio de cultivo en concentraciones de 1.0 a 3.0 mg L⁻¹ se logra el proceso de brotación; en la elongación y enraizamiento, mostraron mayor longitud, hojas y raíces en la concentración ANA 3.0 /BAP 0.3 mg L⁻¹.

No se reporta el uso de reguladores de crecimiento en estudios realizados de cultivo *in vitro* de *Prosthechea vitellina* (Castelán *et al.*, 2013; Jacome-Blasquez *et al.*, 2016); *Prosthechea fragans* (Rodríguez *et al.*, 2007)

3.7.4 Métodos asépticos

El método utilizado por Rodríguez *et al.* (2007) consistió en lavar las cápsulas de *Prosthechea fragans* con detergente comercial al 1.0%. Después de enjuagadas se sumergieron durante 5 minutos en solución de hipoclorito de sodio (NaOCl, 1.0% de cloro activo) más 0.1% Tween® 20. Los enjuagues se hicieron con agua destilada estéril. Posteriormente, en la campana de flujo laminar las cápsulas se sumergieron en una solución de sulfato de cobre al 2.0% durante 5 minutos, luego en hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1.0% durante 5 minutos, y finalmente se enjuagaron con suficiente agua

destilada estéril. Antes de ser seccionadas, las cápsulas fueron sumergidas en alcohol al 70% y flameadas. Para la misma especie se realizó la desinfección superficial de capsulas inmaduras con dos inmersiones en hipoclorito de sodio al 2.5% durante 5 min y enjuagues con abundante agua destilada desionizada estéril durante 2 min realizando la segunda parte en campana de flujo laminar (Salgado y Peñaranda, 2018).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Agrícola del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética, ubicado en el edificio “José D. Molina Galán” (Genética) del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, México. La metodología utilizada para determinar la morfogénesis *in vitro* de *Prosthechea vitellina* se resume en el diagrama representado en la figura 8.

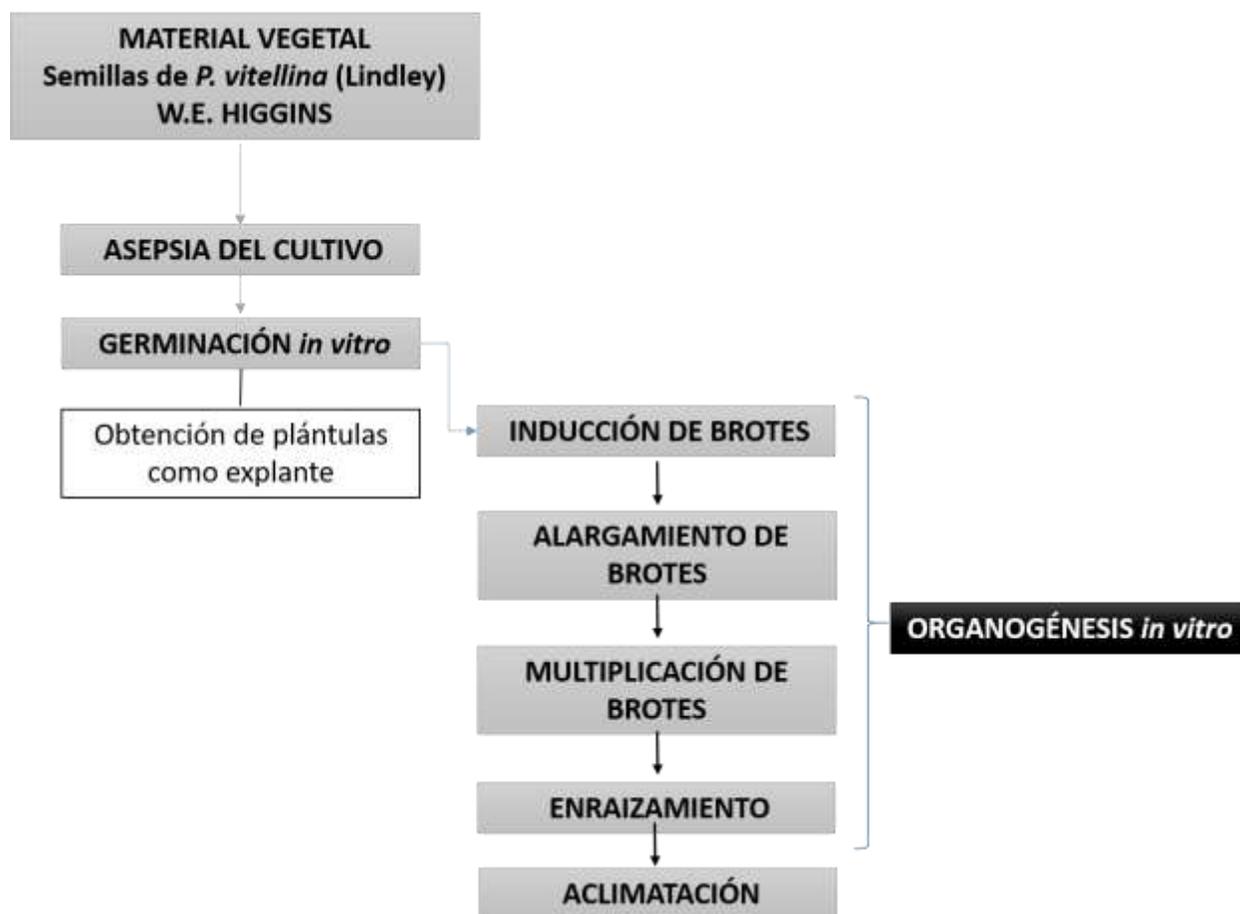


Figura 8. Diagrama de flujo para la morfogénesis *in vitro* de *Prosthechea vitellina*.

4.1 Material vegetal

Se utilizaron cápsulas maduras de *Prosthechea vitellina* colectadas de plantas silvestres en la localidad de San José La Estancia, Coixtlahuaca, ubicada en la región Mixteca del Estado de Oaxaca (Figura 9).

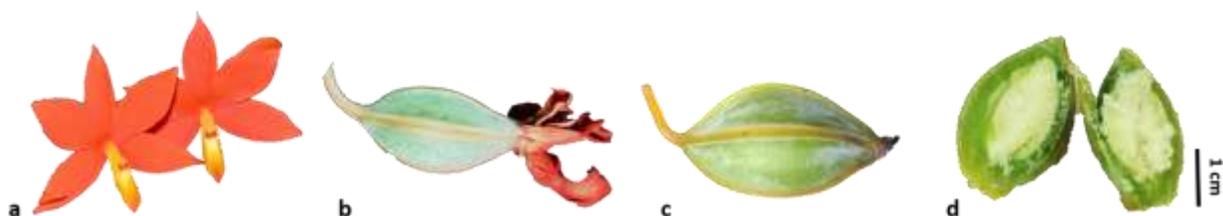


Figura 9. Flores y frutos de *Prosthechea vitellina*. a) Flores; b) Cápsula inmadura de 90 días de edad; c) Cápsula madura de 210 días; d) Cápsula abierta con semillas extraídas manualmente.

4.2 Medio de cultivo y condiciones de incubación

En las diferentes etapas de la investigación se usó el medio básico MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con sacarosa (30 g L^{-1}), myo-inositol (100 mg L^{-1}), ácido nicotínico (0.5 mg L^{-1}), piridoxina (0.5 mg L^{-1}), tiamina (0.1 mg L^{-1}), glicina (2 mg L^{-1}) y solidificado con agar-agar (Merck®, 7 g L^{-1}). El pH del medio se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl 1N con un potenciómetro (Thermo Scientific® modelo Orion 3 Star) antes de adicionar el agar. Se sirvieron de 15 a 30 mL del medio de cultivo en frascos de vidrio de 45 a 125 mL de capacidad. La esterilización se hizo en autoclave vertical (AESAS® modelo 300) a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ y 15 kg cm^{-2} de presión durante 20 min.

Los frascos de cultivo con el material vegetal sembrado de todos los experimentos se mantuvieron en cuarto de incubación con fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad proporcionado por lámparas de luz blanca fría LED de 75 W, temperatura de $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y humedad relativa de 30%.

4.3 Establecimiento del cultivo aséptico

Cápsulas maduras cerradas (210 días después de la polinización) se lavaron con detergente comercial (Roma®) y agua corriente por 5 min en agitación continua. Después se enjuagaron con agua del grifo hasta eliminar el detergente y se trasladaron a la campana de flujo laminar donde se sumergieron en solución de alcohol 70% en agitación por 1 min y se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril. Enseguida se sumergieron en solución desinfectante de hipoclorito de sodio comercial (NaOCl, Cloralex®, 30 % v/v), bactericida a base de plata coloidal estable (Microdyn®, 1% v/v) y Tween® 20 (4 % v/v) por 15 min en agitación continua, enseguida se retiró la mezcla y se adiciono una solución fungicida de Captan® (2 g L⁻¹) y se mantuvo en agitación durante 5 min. Finalmente, la cápsula sin enjuagar se colocó en una caja Petri estéril para extraer y sembrar las semillas en el medio de cultivo.

4.4 Germinación *in vitro*

Las semillas se establecieron en el medio MS con 50% de la concentración de sales dispensado en frascos de vidrio de 45 mL de capacidad con 15 mL del medio adicionado con carbón activado (0.5 g L⁻¹) y diferentes concentraciones de benciladenina (BA) combinadas con ácido naftalenacético (ANA) más un testigo sin reguladores de crecimiento (Cuadro 4).

Cuadro 4. Concentraciones de 6-benciladenina (BA) y ácido 1- naftalenacético (ANA) evaluadas en la germinación *in vitro* de semillas de *Prosthechea vitellina*.

Tratamiento (Núm.)	BA		ANA	
	(mg L ⁻¹)	(µM)	(mg L ⁻¹)	(µM)
1(Testigo)	0.0	0.00	0.0	0.00
2	0.5	2.22	0.0	0.00
3	1.0	4.44	0.0	0.00
4	0.5	2.22	0.1	0.44
5	1.0	4.44	0.1	0.44

4.4.1 Variables cuantificadas

Las variables se contabilizaron cada tercer día durante nueve semanas y correspondieron al inicio de la germinación (días después de la siembra, dds), término de germinación (dds) y oscurecimiento (%). La germinación se registró a partir del momento en el que se observó coloración verde acentuada del embrión y aumento del tamaño en circunferencia y longitud (engrosamiento), que ocasionó el rompimiento de la testa y por tanto, el inicio de la germinación (Pérez-Martínez *et al.*, 2016). El registro de la variable se llevó a cabo por observación directa con ayuda del microscopio y el cálculo del porcentaje de germinación se hizo mediante el conteo de las semillas germinadas y no germinadas al cabo de nueve semanas, con la ayuda del programa Image J.

Se consideró la descripción de estadios descritos y propuestos por Espinosa (2004); Shimura y Koda (2004) y por Seaton y Ramsay (2005) para evaluar la germinación y el desarrollo de los diferentes estadios (Cuadro 5).

Cuadro 5. Estadios ontogénicos observados durante el proceso de germinación *in vitro* de *Prosthechea vitellina.**

Valor del estadio	Nombre	Descripción
1	Semilla con embrión viable, sin germinar	Semilla con embrión y testa de coloración blaquecino.
2	Embrión hinchado	La semilla absorbe agua (imbibición) a través de la testa provocando el aumento de volumen del embrión y la ruptura de la testa.
3	Protocormo con primordio foliar	Formación por división celular del protocormo para después formarse en la región apical el primordio foliar
4	Protocormo con rizoides	Formación de rizoides alrededor de la parte inferior del protocormo
5	Plántula con hojas iniciales (primera hoja)	A partir del primordio foliar se desarrollan la primera hoja fotosintética
6	Plántula con hojas y raíz (segunda hoja)	Formación a partir del primordio foliar la segunda hoja y a la par la formación de raíz en la parte basal del protocormo
7	Plántula con 2 o 3 hojas y raíces	Formación de una tercera hoja, conformando una plántula completa de 2 a 3 cm de altura

*Espinosa (2004); Shimura y Koda (2004); Seaton y Ramsay (2005).

4.4.2 Diseño experimental y análisis

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento donde la unidad experimental correspondió al frasco de vidrio que contenía 15 mL del medio de cultivo. La cantidad de semillas fue variable debido a su tamaño diminuto. Se realizó observación directa al estereomicroscopio lo cual permitió verificar la presencia de embrión en ellas. Se determinó el porcentaje de germinación mediante el conteo directo con la ayuda del programa de procesamiento de imagen digital (ImageJ).

4.5 Regeneración de plántulas por organogénesis

4.5.1 Inducción de brotes

Para inducir la organogénesis se evaluaron como explantes plántulas de 18 semanas de edad germinadas *in vitro* con diferente longitud (1 a 2 cm) (Figura 10) y con tres a cuatro hojas formadas. Se eliminó la raíz y se establecieron cuatro plántulas en frascos de vidrio de 45 mL de capacidad con 15 mL de medio. Se evaluó el efecto de la BA combinado con ANA o AIA (Cuadro 6). A las cuatro semanas se hizo un subcultivo a los mismos tratamientos.



Figura 10. Plántulas de *Prosthechea vitellina* de la misma edad utilizadas como explantes en la inducción de brotes *in vitro*. (A) Plántula de 1.5 cm de altura y sin raíz; (B) Plántula de 1.8 cm de altura; (C) Plántula de 2 cm de altura con hojas más desarrolladas.

Cuadro 6. Concentraciones 6-benciladenina (BA), ácido 1-naftalenacético (ANA) y ácido indolacético (AIA) evaluadas en la inducción de brotes de *Prosthechea vitellina*.

Tratamiento (Núm.)	MS (%)	BA		ANA		AIA	
		(mg L ⁻¹)	(μM)	(mg L ⁻¹)	(μM)	(mg L ⁻¹)	(μM)
1	50	1.1	5.0	0.19	1.0	0.00	0.0
2	50	1.1	5.0	0.38	2.0	0.00	0.0
3	50	1.1	5.0	0.00	0.0	0.18	1.0
4	50	1.1	5.0	0.00	0.0	0.36	2.0
5	50	2.2	10.0	0.19	1.0	0.00	0.0
6	50	2.2	10.0	0.38	2.0	0.00	0.0
7	50	2.2	10.0	0.00	0.0	0.18	1.0
8	50	2.2	10.0	0.00	0.0	0.36	2.0
9	100	1.1	5.0	0.19	1.0	0.00	0.0
10	100	1.1	5.0	0.38	2.0	0.00	0.0
11	100	1.1	5.0	0.00	0.0	0.18	1.0
12	100	1.1	5.0	0.00	0.0	0.36	2.0
13	100	2.2	10.0	0.19	1.0	0.00	0.0
14	100	2.2	10.0	0.38	2.0	0.00	0.0
15	100	2.2	10.0	0.00	0.0	0.18	1.0
16	100	2.2	10.0	0.00	0.0	0.36	2.0

4.5.2 Variables cuantificadas y análisis estadístico

Al término de ocho semanas de cultivo se cuantificó la brotación (%), determinado a partir del número de explantes que generaron brotes), número de brotes por explante (BE) y longitud (cm) de los brotes (LB). El diseño experimental fue completamente al azar simple con 10 repeticiones por tratamiento y cuatro plántulas por frasco de cultivo como unidad experimental. El análisis de varianza de los datos se hizo con el Sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute Inc, 2013) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

4.6 Alargamiento de brotes

En esta etapa se utilizaron grupos de uno a tres brotes de una longitud promedio de 1.02 cm, procedentes de la etapa de inducción. Se colocaron en frascos de vidrio de 90 mL de capacidad que contenían 30 mL de medio básico MS. Se evaluaron dos concentraciones de sales del medio MS (50 y 100 %) sin o con 0.5 g L⁻¹ de carbón activado (Cuadro 6). A las 4 semanas se hizo un subcultivo a los mismos tratamientos.

Los cultivos se incubaron a 26 ± 2 °C en condiciones de fotoperiodo de 16 h (45 μmol m⁻² s⁻¹) durante ocho semanas.

4.6.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico

A las ocho semanas se midió la longitud de los brotes (cm). El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial 2 x 2, con 10 repeticiones por tratamiento y un grupo de brotes por frasco de cultivo como unidad experimental. El análisis de varianza se hizo con el Sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute Inc, 2013) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey (p≤0.05).

4.7 Multiplicación de brotes

Se utilizaron brotes con una longitud promedio de 1.8 cm, procedentes de la etapa de alargamiento, los cuales se cultivaron en frascos de vidrio de 45 mL de capacidad que contenían 15 mL de medio MS con diferentes concentraciones de BA combinadas con ANA o AIA (Cuadro 7).

Cuadro 7. Concentraciones de 6-benciladenina (BA), ácido 1-naftalenacético (ANA) y ácido indolacético (AIA) evaluadas en la multiplicación de brotes de *Prosthechea vitellina*.

Tratamiento (Núm.)	MS (%)	BA		ANA		AIA	
		(mg L ⁻¹)	(μM)	(mg L ⁻¹)	(μM)	(mg L ⁻¹)	(μM)
1	50	1.0	4.5	0.25	1.14	0.00	0.0
2	50	1.0	4.5	0.00	0.00	0.25	1.14
3	50	2.0	9.1	0.25	1.14	0.00	0.00
4	50	2.0	9.1	0.00	0.00	0.25	1.14
5	50	3.0	13.6	0.25	1.14	0.00	0.00
6	50	3.0	13.6	0.00	0.00	0.25	1.14
7	100	1.0	4.5	0.25	1.14	0.00	0.00
8	100	1.0	4.5	0.00	0.00	0.25	1.14
9	100	2.0	9.1	0.25	1.14	0.00	0.00
10	100	2.0	9.1	0.00	0.00	0.25	1.14
11	100	3.0	13.6	0.25	1.14	0.00	0.00
12	100	3.0	13.6	0.00	0.00	0.25	1.14

4.7.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico

A las ocho semanas se contabilizaron las mismas variables de la etapa de inducción indicadas en el apartado 5.6.1. El diseño experimental fue completamente al azar simple con 10 repeticiones por tratamiento y dos brotes por frasco de cultivo como unidad experimental. El análisis de varianza se hizo con el Sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute Inc, 2013) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

4.8 Enraizamiento de plantas

Se utilizaron brotes con una longitud promedio de 3.5 cm, los cuales se plantaron en frascos de vidrio de 90 mL de capacidad que contenían 30 mL de medio MS con 50% de la concentración de sales adicionado con ácido indol-3-butírico (AIB), ácido indolacético (AIA) y ácido naftalenacético (ANA) y un testigo sin reguladores de crecimiento (Cuadro 8). Se hizo un subcultivo a las cuatro semanas.

Cuadro 8. Concentraciones de ácido indol-3-butírico (AIB), ácido indolacético (AIA) y ácido 1-naftalenacético (ANA) evaluadas en el enraizamiento de brotes de *Prosthechea vitellina*.

Tratamiento (Núm.)	AIB		AIA		ANA	
	(mg L ⁻¹)	(µM)	(mg L ⁻¹)	(µM)	(mg L ⁻¹)	(µM)
1(Testigo)	0.0	0.00	0.000	0.00	0.000	0.00
2	0.5	2.46	0.000	0.00	0.000	0.00
3	1.0	4.96	0.000	0.00	0.000	0.00
4	2.0	10.00	0.000	0.00	0.000	0.00
5	0.0	0.00	0.435	2.46	0.000	0.00
6	0.0	0.00	0.870	4.96	0.000	0.00
7	0.0	0.00	1.754	10.00	0.000	0.00
8	0.0	0.00	0.000	0.00	0.464	2.46
9	0.0	0.00	0.000	0.00	0.935	4.96
10	0.0	0.00	0.000	0.00	1.886	10.00

4.8.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico

A las cuatro y ocho semanas se cuantificó el enraizamiento (% calculado por el número de brotes que formaron raíces) y el número de raíces por brote (RB). El experimento se estableció en un diseño completamente al azar simple con 10 repeticiones por tratamiento donde la unidad experimental fueron tres brotes por frasco de cultivo. Se hizo un análisis de varianza con el programa estadístico SAS (SAS Institute Inc, 2013) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

4.9 Aclimatación de plántulas

En esta etapa se evaluaron plántulas enraizadas *in vitro* con dos alturas promedio de 5 y 7 cm. Las plántulas se extrajeron de los frascos y se lavaron con agua tibia y destilada para retirar el medio de cultivo, cuidando las raíces. A continuación, se sumergieron en solución fungicida (Captan®, 0.5 g L⁻¹) durante 20 min y se sembraron en vasos de poliestireno expandido de 118 mL de capacidad con dos tipos de sustrato: corteza de pino fina y una mezcla de peatmoss+agrolita (1:1). Después se aplicó riego con 50% de la concentración de sales del medio MS. Al final las plántulas se cubrieron con vasos de poliestireno cristal de 9x15 cm (diámetro/alto) sellados con un domo del mismo material.

Posteriormente las plántulas se colocaron a temperatura ambiente promedio de 23 ± 3 °C con fotoperiodo de 12 h. Se regaron con 50% de la concentración de sales del medio MS durante las dos primeras semanas y al final de este periodo se hicieron tres perforaciones en el vaso transparente para favorecer la circulación del aire. Se fertilizaron con la solución del medio MS al 50% de la concentración de sales hasta finalizar la evaluación.

4.9.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico

Se cuantifico el porcentaje de supervivencia a las cuatro y ocho semanas. El experimento se estableció en un diseño completamente al azar simple con 20 repeticiones por tratamiento donde la unidad experimental fue una plántula en cada vaso. Se hizo un análisis de varianza con el programa estadístico SAS (SAS Institute Inc, 2013) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ($p\leq 0.05$).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Establecimiento del cultivo aséptico

La metodología empleada para la desinfección superficial de la capsula de semillas de *P. vitellina* resulto efectiva (100%) para la eliminación de microorganismos contaminantes. No se observó contaminación en el explante ni en el medio de cultivo. Lo cual coincide con los resultados obtenidos en semillas de *Prosthechea sp.* donde se obtuvieron semillas libres de contaminación al utilizar enjuagues con agua destilada, detergente y la inmersión en hipoclorito de sodio (NaOCl) por 5 min (Del cristo *et al.*, 2017) y en otras especies del genero *Oncidium* al utilizar diferentes concentraciones de NaOCl (0.5%; 1% y 2%) (Billard *et al.*, 2014). Además, se observó que la utilización de Captan® no resulto fitotóxico. La tolerancia de este ingrediente activo también se ha reportado en diferentes especies vegetales como en *Cedrela odorata* (Sampayo-Maldonado *et al.*, 2017).

5.2 Germinación *in vitro*

El cultivo de semillas de *P. vitellina* en medio MS y adicionado con diferentes concentraciones de BA y ANA, además de carbón activado favorecieron la germinación.

En orquídeas, de acuerdo con Barba *et al.*, (2002), la germinación se define como los estadios secuenciales del proceso de desarrollo del protocormo, terminando cuando se forman las hojas y raíces. En *P. vitellina* se observaron todos los estadios de desarrollo de la germinación y también la formación de hojas y raíces (Figura 11).

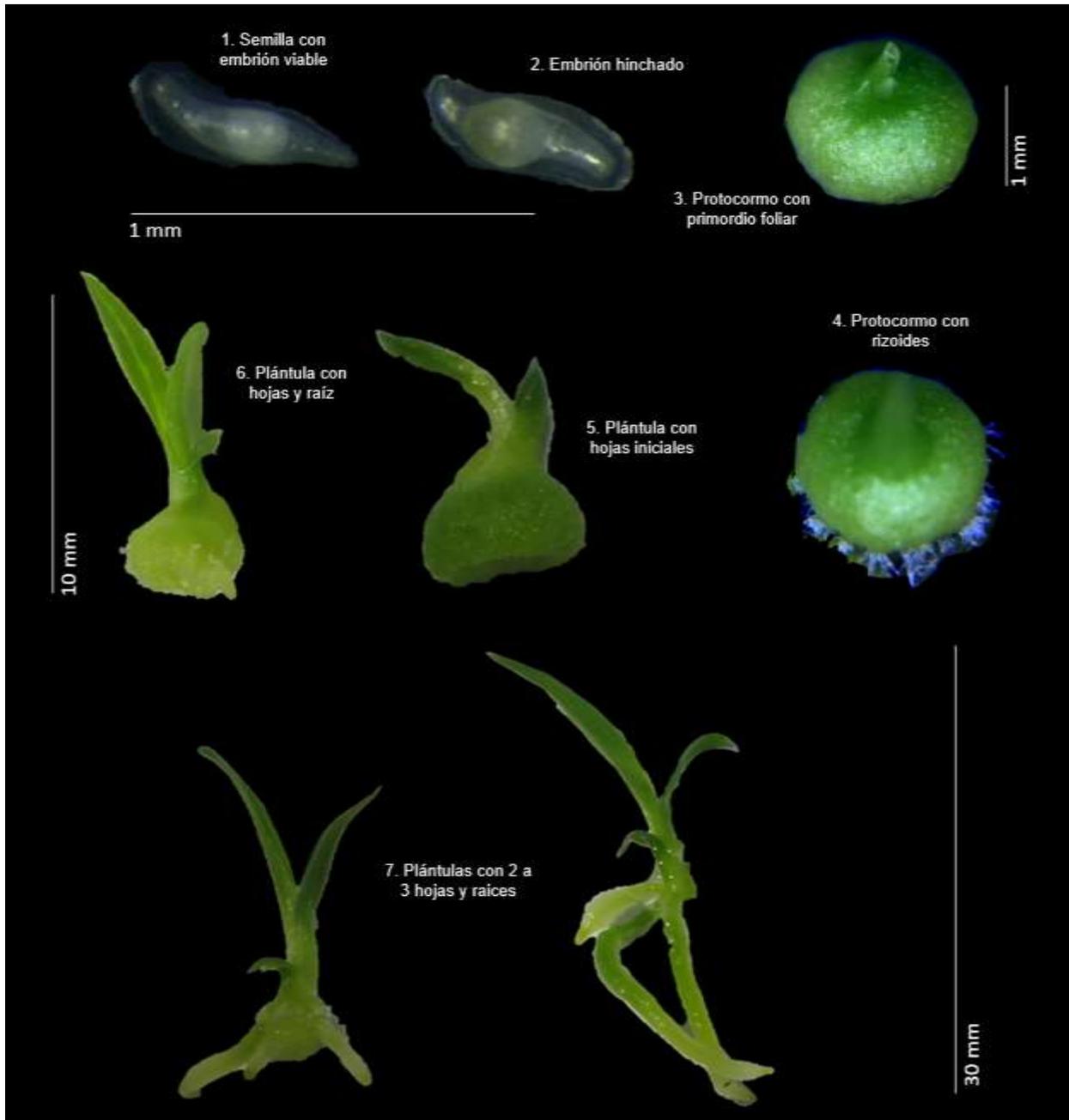


Figura 11. Estadios ontogénicos en la germinación *in vitro* de *Prosthechea vitellina* a lo largo de 22 semanas.

El proceso de imbibición comenzó a los 10 días después de la siembra (dds). En esta etapa las semillas incrementaron su tamaño mediante la absorción de agua a través de la testa y se pudo observar el cambio de coloración del embrión de blanquecino a amarillo ligero, el cual se tornó a verde claro después de 15 días de la siembra. Este incremento de tamaño también se ha documentado en semillas de orquídeas como *L. autumnalis* (Hernández-Muñoz *et al.*, 2017) y *O. bifolium* (Billard *et al.*, 2014), en los cuales la germinación inició a los 5 y 6 días respectivamente.

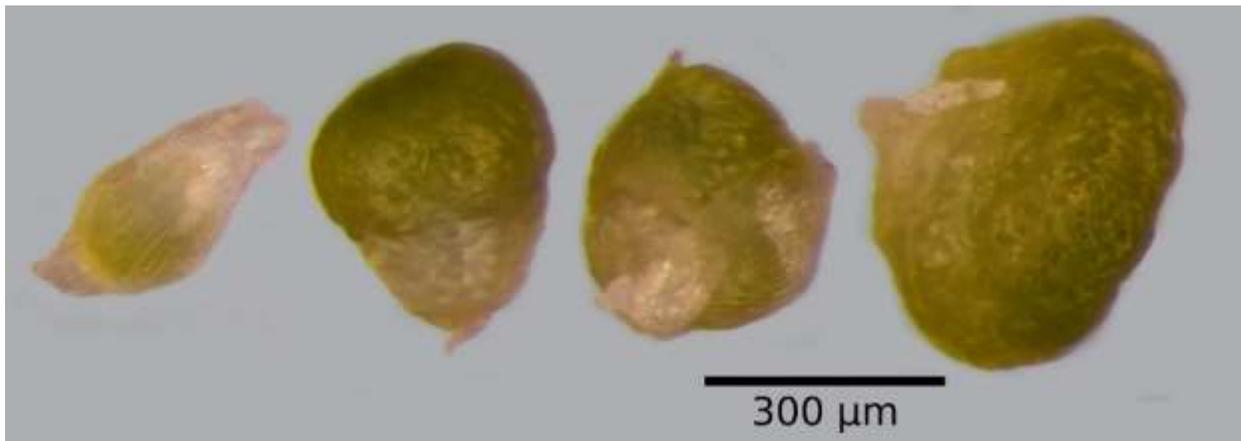


Figura 12. Proceso de imbibición y formación de primordio foliar en semillas de *Prosthechea vitellina* en condiciones *in vitro* a lo largo de 60 días.

Posteriormente, como consecuencia de la absorción de agua que produjo el aumento de volumen del embrión, lo cual, de acuerdo con Barba *et al.*, (2002) propició la división celular en la región anterior provocando la ruptura de la testa, dando lugar a la formación del protocormo, la cual se presentó a los 50 dds, y en el cual se formó, en la región apical una protuberancia llamada primordio foliar, lo cual ocurrió alrededor de los 60 días; los rizoides se formaron a partir de los 65 días alrededor de la parte inferior del protocormo. Posteriormente a partir del primordio foliar se desarrollaron las hojas fotosintéticas y en la parte basal del protocormo se formaron raíces, conformando así una plántula completa con dos a tres hojas y raíces desarrolladas. La etapa del desarrollo de la plántula tuvo lugar del día 70 al día 154 después de la siembra. Estas etapas ocurrieron de manera

similar en especies como *L. speciosa* y *L. autumnalis* en el transcurso de 202 (Aguilar-Morales y López-Escamilla, 2013) y 120 dds (Hernández-Muñoz *et al.*, 2017).

Lo anterior concuerda con el rango de germinación *in vitro* de las orquídeas, mencionado por Lee y Lee (1991) y Cortes (2006) quienes reportan un rango de germinación entre los 30 y 60 días o bien un rango más amplio reportado por Arditti y Ernest (1992), el cual está entre siete y 235 días después de haberlas colocado en un medio de cultivo, a su vez reporta también la obtención de plántulas entre los 50 y 724 días. Arenas y Aguirre (2012), encontraron para *Barkeria scandens* que las semillas alcanzaron el estadio de protocormo con primordio foliar a los 50 días en medio MS. En el caso del género *Prosthechea* no existen datos documentados acerca de los días de germinación de las semillas.

El porcentaje de germinación de *P. vitellina* fue de 91.8 %, aunque no existen evidencias para esta especie si concuerda con lo reportado en otras especies del género como *Catleya mendelii* con un 92.8 % de germinación en semillas de en medio MS sin hormonas (Salazar-Mercado, 2012) o en el caso de *Epidendrum jameisonic* con un 99% de germinación en medio MS adicionado con carbón activado (Muñoz-Barrionuevo, 2011).

5.3 Regeneración de plantas por organogénesis directa

5.3.1 Inducción de brotes

Después de ocho semanas de cultivo, en todos los tratamientos se presentó brotación, los reguladores de crecimiento afectaron significativamente el número y la longitud de los brotes (Apéndice 2). La mayor cantidad de brotes por explante (2.03) se obtuvo con 10 de μM BA y 1 μM de ANA en medio MS completo; en contraste, 5 μM BA y 2 μM de AIA en medio MS con 50% de concentración de sales solo produjo 1.23 brotes. La mayor longitud de los brotes (1.2 cm) se obtuvo con 10 μM BA y 2 μM ANA en una concentración del 100% del medio MS, a diferencia de la menor longitud alcanzada (0.86 cm) obtenida con 5 μM BA y 2 μM ANA con concentración de 50 % del medio MS (Cuadro 9).

Cuadro 9. Número de brotes por explante (BE) y longitud de brotes (LB) inducidos en plántulas *in vitro* de *Prosthechea vitellina* con 6-benciladenina (BA), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolacético (AIA) a las ocho semanas de cultivo.

MS (%)	BA (μM)	ANA (μM)	AIA (μM)	BE (Núm)	LB (cm)
50	5.0	1.0	-	1.78 abc	0.94 abc
50	5.0	2.0	-	1.58 abc	0.86 c
50	5.0	-	1.0	1.55 abc	0.90 bc
50	5.0	-	2.0	1.23 c	0.89 bc
50	10.0	1.0	-	1.60 abc	1.09 abc
50	10.0	2.0	-	1.58 abc	1.01 abc
50	10.0	-	1.0	1.53 abc	1.01 abc
50	10.0	-	2.0	1.85 ab	0.86 c
100	5.0	1.0	-	1.75 abc	1.12 abc
100	5.0	2.0	-	1.80 abc	1.01 abc
100	5.0	-	1.0	1.60 abc	1.02 abc
100	5.0	-	2.0	1.73 abc	1.07 abc
100	10.0	1.0	-	2.03 a	1.13 abc
100	10.0	2.0	-	1.43 bc	1.20 a
100	10.0	-	1.0	1.30 bc	1.10 abc
100	10.0	-	2.0	1.63 abc	1.16 ab

Medias con diferente letra en una columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Los brotes comenzaron a formarse en la base de la plántula, presentando una coloración amarillo claro que después cambió a verde. Al cabo de cuatro semanas de cultivo se observaron brotes con un tamaño promedio de 0.5 cm con hojas semidesplegadas (Figura 13).

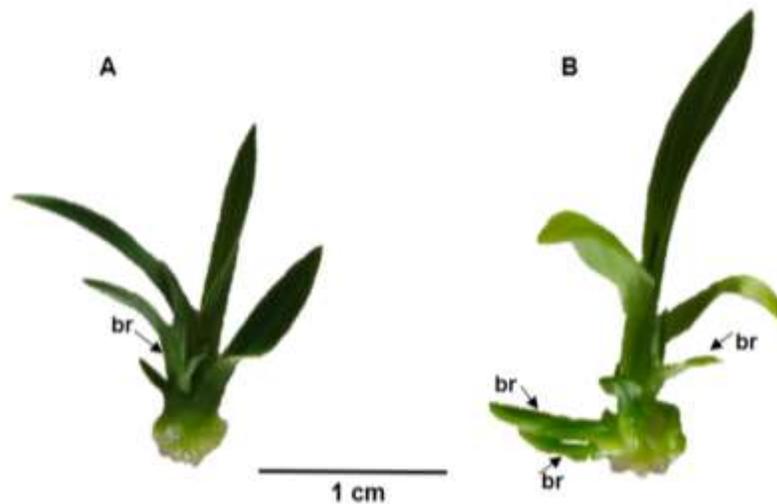


Figura 13. Inducción de brotes *in vitro* en explantes de *Prosthechea vitellina* después de cuatro semanas de su siembra en dos concentraciones de medio MS (1962) suplementado con 6-benciladenina (BA, 5 y 10 μM), ácido 1-naftalenacético (ANA, 1.0 y 2.0 μM) y ácido indolacético (AIA, 1.0 y 2.0 μM).

A las ocho semanas de cultivo los brotes presentaron de dos a tres hojas formadas, fueron de color verde y alcanzaron una longitud de 1 cm (Figura 14).

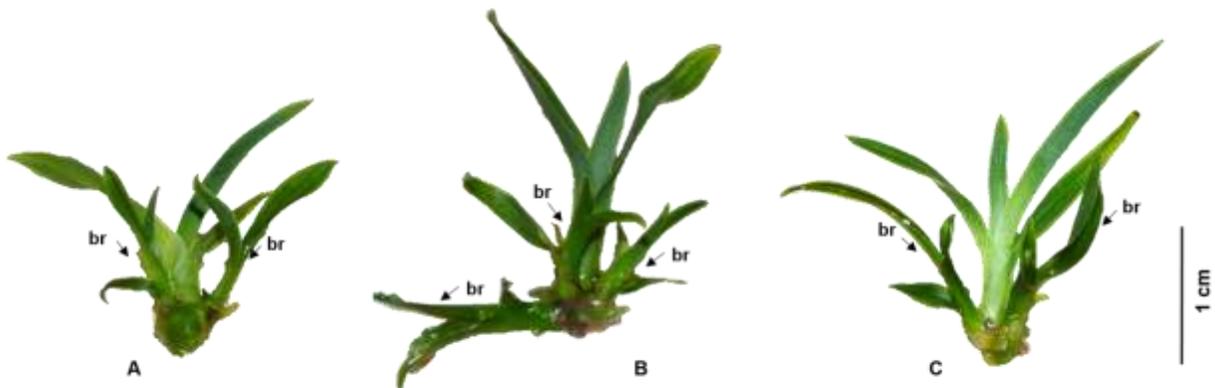


Figura 14. Inducción de brotes *in vitro* de *Prosthechea vitellina* en medio MS completo con A) y B) 10 μM BA + 1 μM ANA y C) 10 μM BA + 2 μM ANA después de ocho semanas de cultivo.

En la literatura es limitada la información sobre la inducción de brotes en el género *Prosthechea*, en cambio sí existen estudios de este proceso en otras especies de orquídeas. En estos estudios se han reportado resultados favorables en el proceso de

organogénesis al utilizar BA en combinación con ANA. Cazarez *et al.* (2016) reportaron en *Prosthechea citrina* (La Llave & Lex.) W. E. Higgins que, en la fase de organogénesis, 3 mg L⁻¹ de BA indujeron la brotación, obteniendo en promedio 6.75 brotes por explante. En otro estudio con *Cattleya trianae* 0.05 mg L⁻¹ de BA produjo 47.2% de brotes, mientras que la ausencia de este regulador la redujo a 33.5% (Gil *et al.*, 2019).

En *Phalaenopsis spp.* (Blume) se emplearon balances hormonales (BAP, 20 µM y BAP, 20 µM/ANA 5.37 µM), en medio MS con 50% de concentración de sales, los cuales permitieron la inducción de brotes en las yemas florales y la combinación de ambos reguladores incrementó significativamente la inducción (Frausto *et al.*, 2019).

5.3.2 Alargamiento de brotes

La concentración del medio de cultivo MS y el carbón activado afectaron significativamente el número de brotes por explante y la longitud de los mismos (Apéndice 3). La mejor respuesta en el crecimiento de los brotes (2.16 cm) se obtuvo con el medio MS a la mitad de la concentración de las sales minerales más 0.5 g L⁻¹ de carbón activado. En cambio, la menor longitud (1.55 cm) se obtuvo en medio MS completo sin carbón activado. El medio MS completo con 0.5 g L⁻¹ de carbón activado produjo el mayor número de brotes con 3.38, mientras con 50% de las sales y sin carbón activado se obtuvieron 2.2 brotes por explante (Cuadro 10).

Cuadro 10. Número de brotes por explante (BE) y longitud del brote (BE) en *Prosthechea vitellina* con 50% y 100% de la concentración del medio MS y 0.5 g L⁻¹ de carbón activado (CA) a las ocho semanas de cultivo.

MS (%) + CA (g L ⁻¹)	Longitud del brote (cm)	Número de brotes (Núm.)
100 +0.5	2.04 a	3.38 a
50 + 0.5	2.16 a	2.72 b
100 + 0.0	1.55 b	2.22 b
50 + 0.0	1.71 b	2.20 b

Medias con diferente letra en una columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

El carbón activado es común agregarlo al medio de cultivo en la micropropagación de orquídeas. Se ha descrito que el carbón activado mejora el crecimiento y la supervivencia de las plantas *in vitro* debido a su función de adsorción de compuestos fenólicos,

compuestos inhibidores y sustancias morfogenéticamente activas o tóxicas no identificadas (Kant *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2006).

En *Laelia flava*, *Miltonia flavescens* y *Oncidium trulliferum* se reportó que 2 g L⁻¹ de carbón activado, en el medio MS completo y a la mitad de la concentración de las sales minerales, mejora la calidad de las plantas *in vitro* y aumenta la supervivencia (Moraes *et al.*, 2003). En *Cattleya labiata* 1.5 g L⁻¹ de carbón activado favorecen el crecimiento de las plántulas *in vitro* después de 8 meses de cultivo (Sipayung *et al.*, 2018). En cultivo en biorreactor de En *Anoectochilus formosanus* y *Dendrobium candidum*, 5 µM de BA y 0.5 g L⁻¹ de carbón activado favorecieron la organogénesis en medio MS semisólido con sistema bioreactor. En *Pecteilis radiata* el carbón activado redujo el oscurecimiento de los protocormos (Kim *et al.*, 2019).

5.3.3 Multiplicación de brotes

Los tratamientos con reguladores de crecimiento afectaron significativamente el número y longitud de los brotes por explante (Apéndice 4). Todos los tratamientos promovieron la brotación pero fue de 100% en las combinaciones de 4.5 µM de BA con 1.14 µM de AIA y 13.6 µM de BA con 1.4 µM de ANA, ambas en medio MS a la mitad de la concentración de las sales minerales, después de 8 semanas de cultivo. La combinación de 4.5 µM de BA y 1.14 µM de AIA favoreció la mayor cantidad de brotes por explante con 2.5 en medio MS con la mitad de concentración de sales. En contraste, la menor respuesta, 1.35 brotes, se obtuvo con 13.6 µM de BA y 1.14 µM de ANA en medio MS completo. La mayor longitud de brote fue de 1.63 cm con 4.5 µM de BA y 1.14 µM de ANA en medio MS con la mitad de la concentración de sales. En cambio, los brotes cultivados en medio MS completo con 13.6 µM de BA y 1.14 µM de ANA solo alcanzaron 0.84 cm de longitud (Cuadro 11).

Cuadro 11. Número de brotes por explante (BE), longitud de brotes (LB) y Brotación (B, %) inducidos en plántulas *in vitro* de *Prosthechea vitellina* con 6-benciladenina (BA), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolacético (AIA) a las ocho semanas de cultivo.

MS (%)	BA (μM)	ANA (μM)	AIA (μM)	BE (Núm)	LB (cm)	B (%)
50	4.5	1.14	-	2.25 a	1.63 a	95 a
50	4.5	-	1.14	2.50 a	1.33 ab	100 a
50	9.1	1.14	-	1.75 ab	1.16 ab	95 a
50	9.1	-	1.14	2.00 ab	1.04 b	95 a
50	13.6	1.14	-	1.85 ab	1.31 ab	100 a
50	13.6	-	1.14	1.90 ab	1.19 ab	95 a
100	4.5	1.14	-	2.05 ab	1.11 b	95 a
100	4.5	-	1.14	1.65 ab	1.13 b	95 a
100	9.1	1.14	-	1.60 ab	1.01 b	75 a
100	9.1	-	1.14	1.65 ab	1.14 ab	90 a
100	13.6	1.14	-	1.35 ab	0.84 b	85 a
100	13.6	-	1.14	1.60 ab	0.89 b	85 a

Medias con diferente letra en una columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Los brotes se observaron a partir de la segunda semana de cultivo, se formaron en la base de la plántula y presentaron coloración verde clara, los brotes crecieron lentamente y no se observó la presencia de callo (Figura 15).

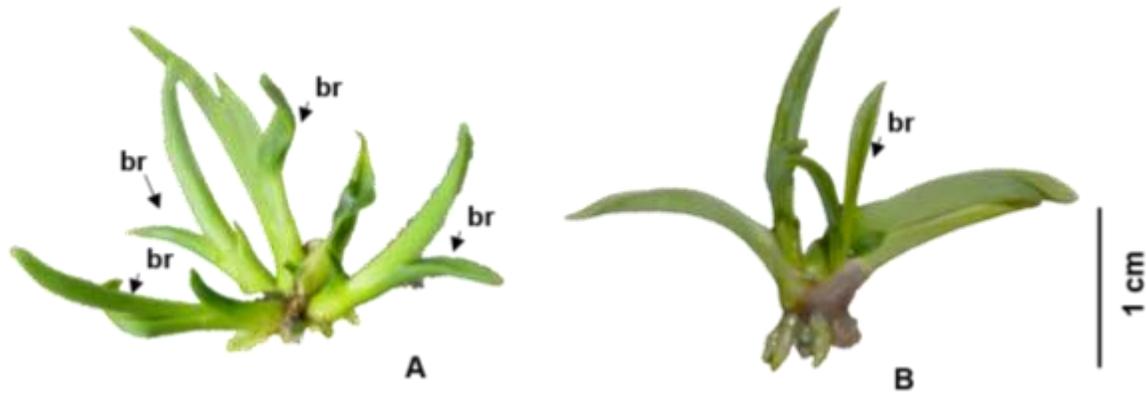


Figura 15. Multiplicación de brotes *in vitro* de *Prosthechea vitellina* en medio MS con la mitad de concentración de las sales con A) 4.5 μM BA + 1.14 μM AIA y B) 4.5 μM BA + 1.14 μM ANA después de ocho semanas de cultivo.

En especies de orquídeas se han reportado respuestas diversas. Pant y Thapa (2012) informaron una rápida micropropagación *in vitro* de *Dendrobium primulinum*, utilizando brotes de 0.3 a 0.5 cm que se obtuvieron de plántulas cultivadas *in vitro*. Observaron que el medio MS con 1.5 mg L⁻¹ de BAP y 0.5 mg L⁻¹ de ANA fue eficaz para la multiplicación de 4.5 brotes por explante. En *Cymbidium aloifolium* se obtuvo un máximo de 39 brotes en medio MS con 4.5 μM de BA en la fase de multiplicación (Kumar *et al.*, 2021). En la multiplicación de *Smithsonia maculata* se obtuvieron 11.25 brotes por explante con 10 mg L⁻¹ de BAP y 1.0 mg L⁻¹ de AIA en medio MS durante 12 semanas de cultivo (Decruse y Gangaprasad, 2018).

En especies de importancia económica como la vainilla también se han realizado estudios de multiplicación *in vitro*. En *Vainilla tahitensis* la dosis de 2.0 mg L⁻¹ de BA favoreció la mejor respuesta con 5 y 6 brotes a los 60 y 90 días de cultivo (Barcia, 2020).

En el género *Prosthechea* son limitados los estudios acerca de la multiplicación *in vitro*, exceptuando el caso de *Prosthechea citrina* en donde 1.5 mg L⁻¹ de BA y 0.15 mg L⁻¹ de ANA promovieron la brotación con 6.75 brotes por explante (Cázarez *et al.*, 2016).

El uso de la citocinina BA en el cultivo *in vitro* promueve la proliferación de orquídeas, porque interviene en la división celular (Raven *et al.*, 1992) y a medida que se producen

más células en un tejido, el potencial de regeneración es mayor (Veltcheva y Svetleva, 2005). Este efecto puede variar según el estado de diferenciación de las células, induciendo la formación de órganos (Gil *et al.*, 2019).

5.3.4 Enraizamiento de plántulas

El mayor porcentaje de enraizamiento (90%) se obtuvo con 4.96 μM de ANA y con 2.46 μM de AIB a las 8 semanas de cultivo, aunque la diferencia no fue significativa con el testigo (83.33%) ni con el resto de los tratamientos (Apéndice 5). El mayor número de raíces (5.27) se produjo con 10 μM de AIB a las ocho semanas de cultivo, que estadísticamente fue similar al testigo (3.97 raíces) (Cuadro 12).

Cuadro 12. Enraizamiento *in vitro* de plántulas de *Prosthechea vitellina* con ácido indol-3-butírico (AIB), ácido indolacético (AIA) y ácido naftalenacético (ANA) a las cuatro y ocho semanas de cultivo.

Regulador de crecimiento (μM)	4 semanas		8 semanas	
	Raíces (Núm.)	Enraizamiento (%)	Raíces (Núm.)	Enraizamiento (%)
0.00	2.37 ab	73.33 a	3.97 a	83.33 a
2.46 AIB	2.93 a	83.33 a	4.47 a	90.00 a
4.96 AIB	1.57 ab	63.33 a	4.23 a	80.00 a
10.00 AIB	1.57 ab	53.33 a	5.27 a	80.00 a
2.46 AIA	2.57 ab	73.33 a	4.30 a	86.67 a
4.96 AIA	2.27 ab	66.67 a	4.47 a	76.67 a
10.00 AIA	1.50 ab	53.33 a	3.30 a	73.33 a
2.46 ANA	2.00 ab	60.00 a	3.53 a	73.33 a
4.96 ANA	2.53 ab	80.00 a	4.50 a	90.00 a
10.00 ANA	1.17 b	63.33 a	3.97 a	86.67 a

Medias con diferente letra en una columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

La presencia de raíces se observó a partir de la segunda semana de cultivo en todos los tratamientos, con coloración clara, casi transparente que con el paso de los días se fue tornando verde claro y algunas partes de color blanco (Figura 16).

Al cabo de la octava semana de cultivo las raíces aumentaron en número y tamaño, tomando la característica forma de las raíces de orquídeas, con coloración verde más oscuro y protegidas por un tejido esponjoso de color blanco o gris, llamado velamen (Figura 17) y en el extremo de la raíz se observó una zona verde la cual tiene una función importante para el desarrollo y nutrición de la planta según Menchaca *et al.* (2011).



Figura 16. Enraizamiento *in vitro* de *Prosthechea vitellina* en medio MS a la mitad de concentración de sales con A) y B) $2.46 \mu\text{M}$ de AIB después de cuatro semanas de cultivo.



Figura 17. Enraizamiento *in vitro* de *Prosthechea vitellina* en medio MS a la mitad de concentración de las sales minerales con A) y B) $10 \mu\text{M}$ de AIB después de ocho semanas de cultivo.

En su mayoría, las auxinas, solas o en combinación con otras auxinas o citocininas, se han utilizado ampliamente para promover el enraizamiento en orquídeas (Mirani *et al.*, 2017). Fukaki y Tasaka (2009) mencionan que las auxinas estimulan la iniciación y el desarrollo de la raíz lateral activando las células del periciclo inactivo. El enraizamiento *in vitro* es la etapa más importante que, en última instancia, puede ser responsable del trasplante exitoso de las plántulas y en donde las auxinas juegan un papel vital. Mirani *et al.* (2017) en su estudio con *Dendrobium nobile* reportaron que las concentraciones de ANA favorecieron plantas más vigorosas que con el AIB en términos de número, longitud y grosor de la raíz. La mayor respuesta en el desarrollo radicular lo obtuvieron con 3.0 mg L⁻¹ de ANA con 3.72 raíces.

De manera similar, en *Prosthechea citrina* las raíces y las hojas mostraron mayor longitud con 3 mg L⁻¹ de ANA y 0.3 mg L⁻¹ de BA y se obtuvieron plántulas con un promedio de longitud máxima en hojas de 2.06 cm y en raíces de 3.82 cm (Cázarez *et al.*, 2016). En *Vanilla planifolia* la adición de 0.5 mg L⁻¹ de AIA promovió el enraizamiento y la pre aclimatación *in vitro* (Carranza-Alvarez *et al.*, 2021). En *Ansellia africana* el porcentaje de enraizamiento más alto se logró con 15 µM de AIB y 30 µM de floroglucinol, lo que resultó en una aclimatación exitosa de las plántulas (Bhattacharyya *et al.*, 2018). De manera similar en *Dendrobium palpebrae* las plántulas derivadas de brotes aumentaron en longitud y en número de raíces desarrolladas en medio MS con 0.5 mg L⁻¹ de ANA (4.82 cm por brote y 2.75 brotes) (Bhowmik y Rahman, 2020). En el caso de enraizamiento de *Dendrobium primulinum* se observó que después de 3 semanas de cultivo la mejor respuesta de enraizamiento la obtuvieron en medio MS con 0.5 mg L⁻¹ de AIA (Pant y Thapa, 2012).

Borges García *et al.* (2011) determinaron en *Dioscorea alata* que concentraciones de 0.01 y 0.1 mg L⁻¹ de ANA así como la combinación de 0.01 de ANA y 0.1 mg L⁻¹ de BA, fueron las más adecuadas para estimular la formación de nuevas raíces.

También se han utilizado auxinas combinadas con compuestos orgánicos como en *Stanhopea tigrina*, donde la adición de 100 mL L⁻¹ de agua de coco, sola o en

combinación con 2.5 o 5.0 mg L⁻¹ de AIA favorecieron la inducción de raíces (Castillo-Pérez *et al.*, 2021).

5.3.5 Aclimatación de plántulas

El tamaño de la plántula tuvo efecto significativo sobre la supervivencia (Apéndice 6). En la cuarta y octava semana se alcanzó el porcentaje más alto con un tamaño de planta de 7 cm en corteza de pino (100%); el porcentaje más bajo (30%) se obtuvo con el tamaño de planta de 5 cm en turba + perlita a las 8 semanas de cultivo (Cuadro 13; Figura 18).

Cuadro 13. Aclimatación de plántulas de *Prosthechea vitellina* con tamaño de 5 y 7 cm con sustrato de corteza de pino (CP) y turba+ Perlita (T+P) después de 4 y 8 semanas.

Sustrato + Tamaño de plántula (cm)	4 semanas	8 semanas
	Supervivencia (%)	Supervivencia (%)
CP + 5	90.0 a	90.0 a
CP + 7	100.0 a	100.0 a
T + P + 5	50.0 b	30.0 b
T + P + 7	100.0 a	80.0 a

Medias con diferente letra en una columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Existen diferentes sustratos para aclimatar plantas de orquídeas. Los sustratos ideales para mantener orquídeas, desde la aclimatación hasta vivero, deben ser durables, inertes, ligeros cuando estén en la maceta, de fácil dren cuando esté sometido a riego y al mismo tiempo que adsorba agua lo suficiente para las raíces y que proporcionen aireación a las raíces (Vera, 2020).

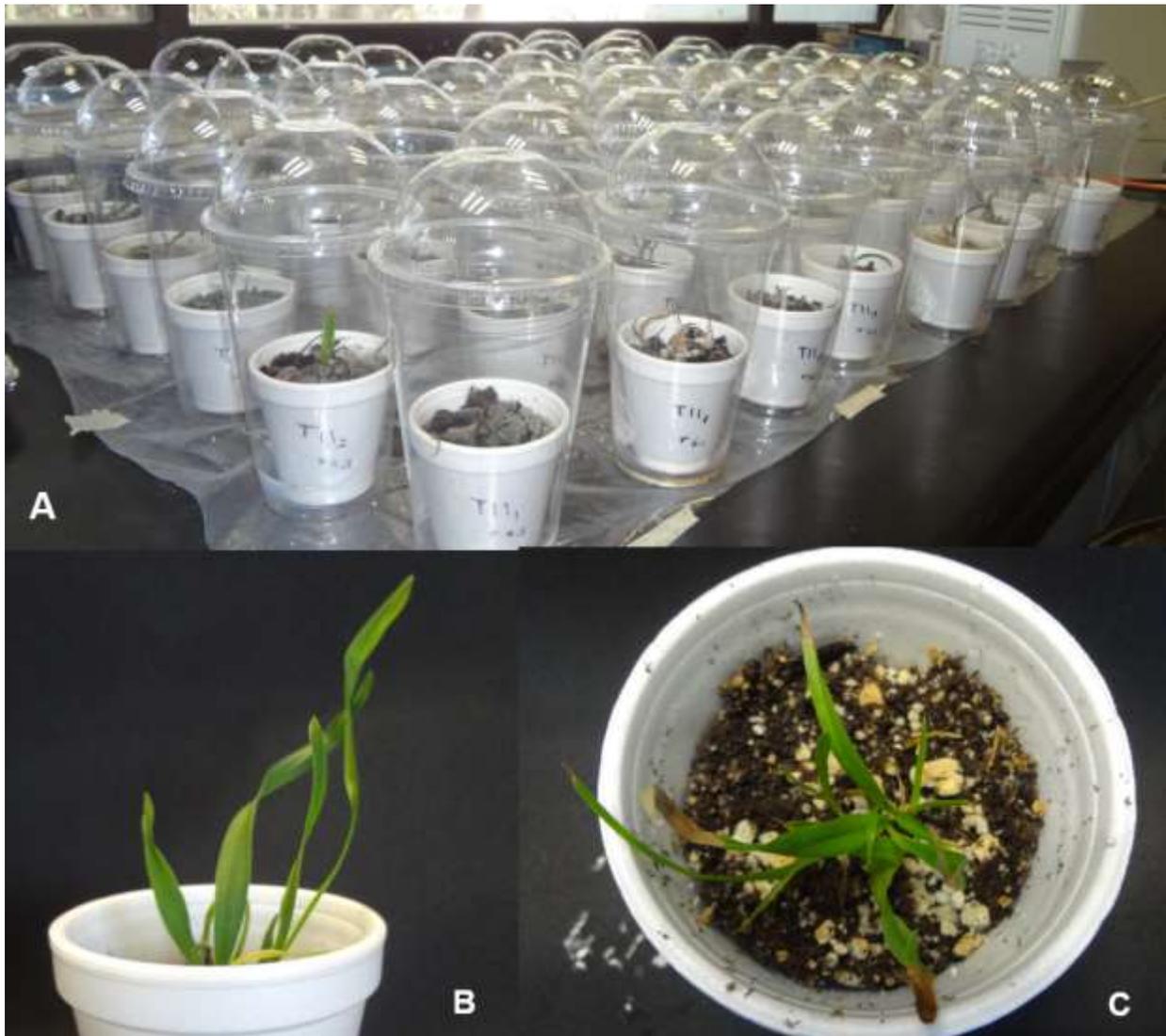


Figura 18. Acimatación de plantas de *Prosthechea vitellina*. A) Plantas después de ocho semanas; B) Planta de 7 cm de altura en corteza de pino y C) Planta de 5 cm de altura en turba + perlita (1:1) a las cuatro semanas.

La corteza de pino es una de los más utilizados, aunque no muestre los mismos resultados en diferentes tipos de orquídeas. La supervivencia de las plantas en la aclimatación depende de los componentes de los sustratos. En *P. citrina* a los 30 días se encontró que las mejores mezclas fueron los sustratos 1:1:1 de corteza de encino, tezontle y carbón donde se sobrevivió el 85% de plantas (Cázarez *et al.*, 2016). Domínguez y Hernández (2006) reportaron 100% de supervivencia de plantas de

Encyclia phoenicia en una combinación de turba, carbón vegetal y grava (1:1:1) y el de menor respuesta fue el que contenía corteza de pino y turba (6:3). A diferencia de los resultados obtenidos en este estudio con *P. vitellina*, en *P. citrina* y *E. phoenicia* la corteza de pino no fue muy favorable para la aclimatación.

Otra combinación de sustrato utilizado en aclimatación es el musgo sphagnum con turba, cáscara de arroz, fibra de coco y carbón, en donde se obtuvo 65% de supervivencia para *Prostechea crassilabia* y 64% para *Sobralia setigera*, y *Epidendrum macrocarpum* a los 60 días de iniciado el proceso (Flores, 2019).

VI. CONCLUSIONES

- La desinfección de semillas de *Prosthechea vitellina* fue del 100%.
- Se obtuvo un porcentaje de germinación *in vitro* de 91.8% en semillas de *Prosthechea vitellina* cultivadas en medio MS con 50% de concentración de sales minerales.
- El mejor resultado en inducción de brotes de *P. vitellina* se obtuvo con 10.0 μM de BA y 1.0 μM de ANA a las ocho semanas. Se obtuvieron en promedio 2.03 brotes por explante.
- La mayor multiplicación de brotes de *P. vitellina* se obtuvo con 4.5 μM de BA y 1.14 μM de AIA en medio MS con 50% de concentración de las sales a las 8 semanas donde se lograron 2.5 brotes por explante.
- La mejor respuesta en alargamiento de brotes de *P. vitellina* se consiguió en el medio MS con 50% de concentración de las sales y 0.5 g L⁻¹ de carbón activado. Se obtuvieron brotes con 2.16 cm de longitud.
- El mayor porcentaje de enraizamiento (90%) de *P. vitellina* se alcanzó con 4.96 μM de ANA en medio MS con 50% de concentración de sales a las ocho semanas. Se obtuvieron en promedio 5.27 raíces por explante con 10 μM de AIB a las ocho semanas.
- Se obtuvo 100 % de supervivencia en la aclimatación a partir de plantas *in vitro* de *P. vitellina* de 7 cm en corteza de pino después de ocho semanas.
- Se desarrolló un protocolo de regeneración de plantas de *P. vitellina* por organogénesis directa a partir de plántulas germinadas *in vitro*. Este protocolo representa una opción importante para la propagación *in vitro* de la especie con fines de rescate, conservación, reintroducción y aprovechamiento comercial.

VIII. LITERATURA CITADA

- Aguilar-Morales M.A., A. L. López-Escamilla (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. 3:18-25.
- Alcantara-Cortes J. S., J. G. Acero G, J. D. Alcántara C, and R. M. Sánchez M. (2019)** Main hormonal regulators and their interactions in plant growth. *Nova* 17:109-129.
- Arditti J. (2008)** Micropropagation of orchids, 2nd Ed. Willey- Blackwell. Oxford, UK.
- Arditti J. and A. K. Ghani (2000)** Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist* 145:367-421
- Arditti J. and A. K. Ghani (2000)** Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytology*. 145:367 - 421.
- Arditti J. y R. Ernst (1992)** Micropropagation of orchis. John Wily and Sons Inc. NY
- Arditti J., A. D. Krikorian (1996)** Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators. *Botanical Journal of the Linnean Society* 122:183-241.
- Arenas E. B. y E. Aguirre L. (2012)** Micropropagación aplicada a la conservación de *Barkeria scandens* (La Llave & Lex.) Dressler & Halb. (Orchidaceae) mediante el empleo de semillas inmaduras. UNAM. México, D.F. 88-93.
- Argueta A. y A. Aguilar (1993)** Floras indígenas locales. En Bondani, A., Sanfilippo, J. (coords.) La Investigación Científica de la Herbolaria Medicinal Mexicana. Secretaría de Salud, México. pag. 116-11
- Avila D. I., y R. Salgado-Garciglia (2013)** Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Ciencias Biológico Agropecuarias* 8:138–149.
- Banda-Sánchez L. Y., H. Pinzón A, L, E. Vanegas M. (2017)** Características físicas y germinativas de semillas de la orquídea *Prosthechea* sp. de la zona andina, Fusagasugá, Colombia 18:1.
- Barba A. A., R. S. Luna, A. J. Romero (2002)** Orquideología básica. Biotemas. UNAM. México. 18 p.
- Barcia J. B. S (2020)** Evaluación de diferentes dosis de la citocinina BAP en la propagación *in vitro* de *Vainilla tahitensis*. Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias Agrarias Universidad de Guayaquil.

- Behar M. y O. Tinschert (1998)** Guatemala y sus orquídeas. Editorial. BANCAFE. MayaPrin, Guatemala. 240 p
- Bell A. D., and A. Bryan (1991)** Plant from- An illustrated Guide to Flowering Plant Morphology. Oxford University Press, Orford.
- Bellone R. (2006)** Orquídeas. Guía del aficionado. Ediciones Omega. México. 305- 333.
- Bertolini V., A. Damon, F. R. Luna T. y A.N. Rojas V. (2012)** Las orquídeas del Valle del Mezquital, Hidalgo (México), resultados preliminares. Chapingo 11:85-94.
- Bhatia S. y T. Bera (2015)** Embriogénesis somática y organogénesis. Aplicaciones modernas de la biotecnología vegetal en las ciencias farmacéuticas. 209-230.
- Bhatia S., K. Sharma, R. Dahiya y T. Bera (2015)** Aplicaciones modernas de la biotecnología vegetal en las ciencias farmacéuticas. Prensa académica.
- Bhattacharyya P., V. Kumar y J. Van Staden (2018)** Almacenamiento a corto plazo basado en encapsulación *in vitro* y evaluación de la homogeneidad genética en *Ansellia africana* (orquídea leopardo) regenerada utilizando marcadores moleculares dirigidos a genes. *Journal of Plant Biotechnology* 133:299-310.
- Bhowmik T. K. y M. M. Rahman (2020)** Micropropagación de la orquídea comercialmente importante *Dendrobium palpebrae* Lindl. a través del cultivo de pseudobulbos desarrollado *in vitro*. *Revista de biotecnología avanzada y terapéutica experimental* 3:225-232.
- Billard C. E., C. A. Dalzotto y V. H. Lallana (2014)** Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *Oncidium*. *Polibotánica* 38:145-157.
- Boeri P. (2015)** Plantas de Probeta: Manual para la Propagación de Plantas por Cultivo de Tejidos *In Vitro*. Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires, Argentina. pp: 45-72.
- Bonilla-Sánchez A. P. y H. H. Mosquera-Mosquera (2019)** Viabilidad y germinación *in vitro* de taxones de las tribus *Cymbidieae* y *Epidendreae* (subfamilia Epidendroideae, Orchidaceae). *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 43:494-501.
- Borges G. M., R. Destrade B, S. Meneses R, R. Gómez K, B. Malaurie, P. Hamon, L. C. Demenorval (2011)** Optimización de un medio de cultivo para plantas micropropagadas de *Dioscorea alata* L. *Revista Colombiana de Biotecnología* 13:221-228.
- Bouharmont J. (1994)** Application of Somaclonal Variation and *in vitro* Selection to Plant Improvement. *Acta Horticulturae* 355: 213-331.

- Cabral E. L. (2010)** Monocotiledóneas. Diversidad Vegetal, biotaxonomía de spermatofitas. Ed. Universidad Nacional del Noroeste. Corrientes, Argentina. 206 p.
- Calevo J., A. Giovannini, L. Cornara, S. Peccenini, F. Monroy (2017)** Orchis patens seed morphology of an endangered Mediterranean orchid. *Journal Dealing. Aspect Plant Biology* 0:1–5.
- Calva C. G., V. J. Pérez. (2005)** Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. Revista digital universitaria. IPN 6:11.
- Cancino-Escalante G. O., E. Quevedo G, C. Edilia V, y C. Díaz C. (2015)** Propagación *in vitro* de materiales seleccionados de Rubus glaucus Benth (mora de Castilla) en la provincia de Pamplona, región nororiental de Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología* 17: 7-15.
- Cano N. N. (2013)** Importancia y uso de las orquídeas silvestres en el Estado de Guerrero. Memoria del Segundo encuentro Mexicano de Orquidología. Guerrero Mexico.
- Carranza-Álvarez C., K. L. Trinidad-García, H. Reyes-Hernández, L. J. Castillo-Pérez y J. Fortanelli-Martínez (2021)** Efecto de extractos orgánicos naturales sobre la micropropagación de Jacks. ex Andrews (Orchidaceae). *Biotecnia* 23:5-12.
- Castelán C. S. F., R. Menchaca-García y M. Á. Lozano-Rodríguez (2013)** Cultivo *in vitro* de *Prosthechea vitellina* (Lindl.) W.E. Higgins. Memoria del Segundo encuentro Mexicano de Orquidología. Guerrero Mexico.
- Castellanos M. C., P. Wilson, S. J. Keller, A. D. Wolfe y J. D. Thomson (2006)** Otra evolución: estrategias de presentación del polen cuando los polinizadores difieren. *El naturalista estadounidense* 167:288-296.
- Castillo-Pérez L. J., D. Martínez-Soto, J. Fortanelli-Martínez y C. Carranza-Álvarez (2021)** Germinación asimbiótica de semillas, desarrollo *in vitro* de plántulas y aclimatación simbiótica de la orquídea mexicana amenazada *Stanhopea tigrina*. *Journal of Plant Biotechnology* 1-9.
- Cazarez F. T. L., J. Graciano L., S. Solís G., B. Díaz R., J. A. Nájera L., J. B. Montoya A. (2016)** Propagación *in vitro* de la orquídea *Prosthechea citrina* (La Llave & Lex.) W.E Higgins nativa del estado de Durango, México. *Investigación y Ciencia* 24: 19–25.
- Cetzal-Ix W., R. Alvarez-Mora, S. K. Basu, J. Cosme-Pérez y E. Noguera-Savelli (2014)** Orchid fruit diversity at Puebla Mexico: A new insight into the biodiversity of a fragmented ecosystem with need for conservation and potential for horticultural exploitations in future. *Sustainable Horticultural Systems* (pp. 207-220).

- Chase, M.W., K.M. Cameron, R.L. Barrett y J.V. Freudenstein (2003)** "DNA data and Orchidaceae systematics: A new phylogenetic classification". En: K.W. Dixo, S.P. Kell, R.L. Barrett y P.J. Cribb (eds.). *Orchid conservation*. Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu, Sabah. pp. 69-89
- Chen T. Y., J. T. Chen, W. C. Chang (2002)** Multiple shoot formation and plant regeneration from stem nodal explants of *Paphiopedilum* orchids. *Biology Plant*. 38:595-597.
- CITES (2013)** Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (Numbers of species listed in the CITES Appendices <https://cites.org/eng/disc/species.php>. Fecha de consulta: octubre 2016.
- CONABIO (2010)** Riqueza natural. <http://www.biodiversidad.gob.mx/pais/riquezanat.html>. Fecha de Consulta: Fecha de consulta: septiembre 2016.
- Cox T., L. (2013)** Orquídeas: Importancia y uso en México. *Ciencias Biológicas*. Universidad Autónoma de Yucatán. 4 p.
- Cruz F. P. (2012)** Cultivo de tejidos vegetales (manual de prácticas). Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlan, 39 p. http://asesorias.cuautitlan2.unam.mx/fondo_editorial/comite_editorial/manuales/cultivosdetejidosvegetales_manualprac.pdf
- Cruz G. G., R. Solano G., L. Lagunez R. (2014)** Documentation of the medicinal knowledge of *Prosthechea karwinskii* in a Mixtec community in México. *Brasileira de Farmacognosia* 24: 153–158.
- Damon A., E. Aguilar-Guerrero, L. Rivera, V. Nikolaeva (2004)** Germinación *in vitro* de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México. *Rev. Chapingo Serie Horticultura*. 10 (2): 195-203.
- Decruse S. W. y A. Gangaprasad (2018)** Restauración de *Smithsonia maculata* (Dalz.) Saldanha, una orquídea endémica y vulnerable de Western Ghats mediante propagación *in vitro*. *Journal Orchid Society India* 32:25-32,
- Del Cristo B. S. L., Y. H. Pinzón-Ariza y L.E. Vanegas-Martínez (2017)** Características físicas y germinativas de semillas de la orquídea *Prosthechea sp.* de la zona andina, Fusagasugá, Colombia. *Biota Colombiana* 18: 80-87, Redalyc, <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49154105006>.
- Domínguez R. Y. y G. Hernández Del V. (2006)** Aclimatación de plantas *in vitro* de *Encyclia phoenicia* (Ldl.) Neum. (Orchidaceae) en diferentes sustratos. *Biotecnología Vegetal* 6:225-240.
- Dressler R. L. (1981)** The orchids. Natural history and classification. Cambridge: Harvard University Press.

- Dressler, R. L. y G. E. Pollard (1974)** El Género *Encyclia* en México. Asociación Mexicana de Orquideología. México.
- Echenique V., G. Levitus, C. Rubistein, E. Hopp y L. Mroginski (2010)** Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. INTA. pp: 230-240.
- Emeterio-Lara A., V. Palma-Linares, L. M. Vázquez-García y J. Mejía-Carranza (2016)** Usos y comercialización de orquídeas silvestres en la región sur del estado de México. *Polibotánica* 42:197-214.
- Espejo S. A. (2012)** El endemismo en las Liliopsida mexicanas. *Acta botánica mexicana* 100:195–257.
- Fanfani A. and W. Rossi (1989)** Guide to orchids. Simon and Schusters. New York. p 256.
- Flores H. K. (2019)** Micropropagación de orquídeas a partir de semillas en condiciones de cultivo *in vitro*. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, <http://hdl.handle.net/20.500.12918/5185>
- Frausto J. K. A., Ma. C. Ojeda Z., O. G. Alvarado G., E. A. García. Z., H. Rodríguez F. y G. Rodríguez P. (2019)** Inducción de brotes a partir de varas florales de la orquídea *Phalaenopsis* spp. (Blume) *in vitro*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas* 10: 1207-1218, <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.608>.
- Frugis G. (2019)** Desarrollo vegetal y organogénesis: de los principios básicos a la investigación aplicada. *Plantas*, 8: 299
- Fukaki H. and M. Tasaka (2009)** Hormone interactions during lateral root formation. *Plant molecular biology* 69:437, <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9417-2>.
- Gamborg O. L., R. Miller y K. Ojima (1968)** Requerimientos de nutrientes de cultivos en suspensión de células de raíz de soja. *Investigación de células experimentales* 50:151-158.
- Gamborg, O. L. (2002)** Plant tissue culture. Biotecnology. *In vitro Cellular Developed Biology Plant* 38:84-62.
- Garay-Arroyo A., M. de la Paz S., B. García-Ponce, E. R. Álvarez-Buylla y C. Gutiérrez (2014)** La Homeostasis de las Auxinas y su Importancia en el Desarrollo de *Arabidopsis Thaliana*. *Revista de educación bioquímica* 33:13-22.
- García-Cruz, J., L. M. Sánchez S., R. Jiménez M., R. Solano G. (2003)** Flora del Bajío y de regiones adyacentes. *Herbario AMO* 119: 178.

- García-Pérez, P., E. Lozano-Milo, M. Landín y P. P. Gallego (2020)** La tecnología de aprendizaje automático revela las interacciones ocultas de las fitohormonas en la organogénesis *in vitro* de plantas medicinales. *Biomoléculas* 10: 746.
- George E. F., M. A. Hall, G. J. Klerk (2008)** Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition. 2008. p. 1-501.
- Gil C. A. I., C. A. Ariza C., L. M. Castillo T., L. E. Salgado D., L. Banda S., L. E. Vanegas M. (2019)** Inducción de organogénesis *in vitro* con 6-bencilaminopurina en *Cattleya trianae* Linden & Rchb.f. *Revista Actualidad y divulgación científica* 22: 1275, <https://doi.org/10.31910/rudca.v22.n2.2019.1275>
- Gil C. A. I., D. F. Contreras P., L. C. Gutiérrez R. (2016)** Establecimiento *in vitro* de protocormos de *Prosthechea* sp. bajo diferentes concentraciones de ácido naftalenacético. *Rev. Mutis* 6: 6–15.
- Gisbert D. M. C. (2011)** Morfogénesis: la ruta organogénica versus la ruta embriogénica. Universidad Politécnica de Valencia. España. 5p.
- Goh C. J., and J. Arditti (2018)** Orchidaceae. *CRC Handbook of Flowering* 309-336 p.
- Gupta R., S. K. Chakrabarty (2013)** Gibberellic acid in plant: Still a mystery unresolved. *Plant Signal Behav* 89.
- Hágsater E., M. Á. Soto Arenas, G. A. Salazar Chávez, R. Jimenez Machorro, M. A. López Rosas y R. L. Dressler (2005)** Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, México.
- Hamer F. (1974)** Las Orquídeas de El Salvador. Ministerio de Educación, Dirección de Publicaciones. San Salvador, El Salvador.
- Hernández-Muñoz S., M. E. Pedraza-Santos, P. A. López, E. D. L. Cruz-Torres, S. P. Fernández-Pavía, A. Martínez-Palacios y M. Martínez-Trujillo (2017)** Determinación de la DL50 Y GR 50 con rayos gamma (60Co) en protocormos de *Laelia autumnalis in vitro*. *Agrociencia* 51:507-524.
- Hossain M. M., M. Sharma, J. A. T. Silva and P. Pathak (2010)** Seed germination and tissue culture of *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl. *Scientia Horticulturae* 123: 479-487.
- Iliev I., A. Gajdosová, G. Libiaková, and S. M. Jain (2010)** Plant micropropagation. In: Davey, M., R., y P. Anthony. (ed). *Plant Cell Culture: Essential Methods*. J. Wiley, Chennai, India. pp 1-20.
- Jacome-Blasquez F., V. Morales-Ramos, M. D. J. Martínez-Hernández, G. Sanchez-Viveros y J. J. Bello-Bello (2016)** Respuesta al estrés hídrico inducido por clavijas

- en la germinación *in vitro* de *Prosthechea vitellina* (Lindl.) WE Higgins (Orchidaceae). *Propagación de plantas ornamentales* 16:73-78.
- Kant R., A. Gupta y M. M. Hossain (2016)** Micropropagation of Orchids through leaf culture. *In vitro* of comercial flowering plants: Orchids. SERBD Books. India. Cap. 4. 35 p.
- Katsalirou E., A. Gerakis y X. Haldas (2019)** Tiempos óptimos de escarificación para semillas de dos orquídeas mediterráneas. *Revista europea de ciencias ambientales* 9:47-52.
- Kim D. H., K. W. Kang, G. Enkhtaivan, U. Jan y I. Sivanesan (2019)** Impacto del carbón activado, la concentración del medio de cultivo y el tidiázurón en la germinación de semillas *in vitro* no simbióticas de *Pecteilis radiata* (Thunb.) Raf. *Revista Sudafricana de Botánica* 124:144-150.
- Knudson L. (1922)** Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette* 73: 1-25.
- Knudson L. (1946)** A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society* 15: 214-217.
- Kumar A., S. Chauhan, S. Rattan, A. R. Warghat, D. Kumar y B. Bhargava (2021)** Propagación *in vitro* y evaluación fitoquímica de *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw: una orquídea de importancia farmacéutica y hortícola. *Revista Sudafricana de Botánica* 144:261-269.
- Kumar V., M. M. Naidu and G. A. Ravishankar (2006)** Developments in coffee biotechnology- *in vitro* plant propagation and crop improvement. *Plant Cell Tissue*. 87: 49-65.
- Lallana V. H., C. E. Billard, P. D. Reinoso, V.A. Martínez, y L. F. García (2020)** Banco de Germoplasma de orquídeas nativas de la región litoral. *Ciencia, Docencia y Tecnología Suplemento* 10(10).
- Lapiner J. (1973)** Orquídeas Michoacanas. Comisión Forestal del Estado de Michoacán (CFEM). Serie técnica 4.
- Linsmaier E. M y F. Skoog (1965)** Requerimientos de factor de crecimiento orgánico de cultivos de tejidos de tabaco. *Physiology plant* 18:1.
- Lo S.F., S. M. Nalawade, C. L. Kuo Chen, H. S. Tsay (2004)** Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and ex vitro establishment of plantlets of *Dendrobium tosaense* Makino—a medicinally important orchid. *In Vitro Cellular Developed Biology Plant* 40:528–535.
- Ma X., J. Kang, S. Nontachaiyapoom, T. Wen and K. D. Hyde (2015)** Non-mycorrhizal endophytic fungi from orchids. *Curr. Science* 109:72–87.

- Maharjan S., L. S. Thakuri, B. B. Thapa, S. Pradhan, K. K. Pant, G. P. Joshi y B. Pant (2020)** Propagación *in vitro* de la orquídea en peligro de extinción *Dendrobium chryseum* Rolfe a partir de cultivo de protocolos. *Revista de Ciencia y Tecnología de Nepal* 19:39-47.
- Mahmood I., and A. Razzaq (2017)** Responses of explant type of wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes to different tissue culture media. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka* 45: 265-271
- Martija O. M. (2007)** El gran libro de las orquídeas. Ed. De Vecchi. México. 189 p.
- Mayo M. A., J. G. C. Cázares, E. L. De la Cruz, A. H. Flores (2010)** Germinación *in vitro* de semillas y desarrollo de plántulas de orquídeas silvestres de Tabasco. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 32 p.
- Menchaca G., R. A., D. Moreno M. (2011)** Conservación de orquídeas, una tarea de todos. Red Quelites, Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (México), Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México.
- Menchaca G., R. A., M. A. Lozano R., L. Sánchez M. (2012)** Estrategias para el aprovechamiento sustentable de las orquídeas de México. *Revista mexicana de ciencias forestales* 3: 09–16.
- Menchaca R. A. y D. Moreno M. (2011)** Manual para la propagación de Orquídeas. CONAFOR. México. 56 p.
- Mirani A. A., A. A. Abul-Soad y G. S. Markhand (2017)** Enraizamiento *in vitro* de la orquídea *Dendrobium nobile*: múltiples respuestas a las combinaciones de auxinas. *Notulae Scientia Biologicae* 9:84-88.
- Molina D. M., M.E. Aponte, H. Cortina, and G. Moreno (2002)** The effect of genotype and explant age on somatic embryogenesis of coffee. *Plant Cellular Tissue* 71: 117-123.
- Moraes L. M., R. T. Faria y F. L. Cuquel (2003)** Carbón activado para la propagación *in vitro* de orquídeas brasileñas. *V Simposio Internacional sobre Nuevos Cultivos Florícolas* 683:383-390.
- Morel G. (1960)** Producing virus-free *cymbidium*. *American Orchid Society Bulletin* 29: 495-497.
- Muñoz-Barrionuevo M. (2011)** Evaluación de medios de cultivo para la germinación *in vitro* de las orquídeas *Cytochilum macranthum* y *Epidendrum jameisonic* Rchb. F. Facultad de Ingeniería Agronomica. Universidad técnica de Ambato. Ecuador.

- Murashige T. and F. Skoog (1962)** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497, <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Murthy H. N., A. N. Pyati (2001)** Micropropagation of *Aerides maculosum* Lindl. (Orchidaceae). *In vitro Cellular Developed Biology Plant* 37:223-226.
- Murthy H. N., K. Y. Paek and S. Y. Park (2018)** Micropropagation of orchids by using bioreactor technology. In *Orchid propagation: from laboratories to greenhouses—methods and protocols*. Humana Press, New York, NY. pp. 195-208.
- Olmos S., G. Luciani y E. Galdeano (2010)** Micropropagación. En: Levitus, G., V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski. (eds). *Bioteconología y Mejoramiento Vegetal II*. ArgenBio, Argentina. pp: 353-362.
- Osuna P. A., y C. Saucedo (2010)** Propagación *in vitro* de vid variedad Globo Rojo. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Chihuahua, México. 32 p.
- Pant B. (2013)** Orquídeas medicinales y sus usos: El cultivo de tejidos es una alternativa potencial para la conservación. *Revista africana de ciencia de las plantas* 7:448-467.
- Pant B. and D. Thapa (2012)** *In vitro* mass propagation of an epiphytic orchid, *Dendrobium primulinum* Lindl. Through shoot tip culture. *African Journal Biotechnology* 11: 9970-9974, DOI: 10.5897 / AJB11.3106.
- Park S.Y., K. S. Shin, and K. Y Paek (2006)** Increased ethylene and decreased phenolic compounds stimulate somatic embryo regeneration in leaf thin section cultures of *Doritaenopsis hybrid*. *Journal Plant Biology* 49:358– 363, <https://doi.org/10.1007/BF03178812>.
- Paul M., T. Islam, R. H. Sarker y M. I. Hoque (2019)** Propagación masiva *in vitro* de *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. *Cultivo de tejidos vegetales y biotecnología* 29:73-79.
- Perea D. M. y A. Tirado P. (2011)** Cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Manual de prácticas de laboratorio. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 158 p.
- Perianez-Rodríguez J., C. Manzano y M. A. Moreno-Risueno (2014)** Organogénesis post-embrionaria y regeneración vegetal a partir de tejidos: ¿dos caras de una misma moneda. *Fronteras en ciencia vegetal* 5:219.
- Pongener A., C. r. Deb (2011)** *In vitro* regeneration of plantlets of *Cymbidium iridioides* D. Don using nodal segments as explants. *Journal Applications Biotechnology* 1:389-400.

- Predieri S. (2001)** Mutation Induction and Tissue Culture in Improving Fruits. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 64: 185-210.
- Radice S. (2010)** Morfogénesis *in vitro*. Disponible en: <http://www.biblioteca.org.ar/libros/150404.pdf>. Argentina
- Rangel-Estrada S. E., E. Hernández-Meneses y M. G. Hernández-Arenas (2016)** Micropropagación de variedades de caña de azúcar cultivadas en México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 39: 225-231.
- Raven P. H., R.F. Vert y S. E. Eichorn (1992)** Biología de las Plantas. Ed. Reverté. España. 402p.
- Razdan M. K. (2003)** Introduction to plant tissue culture. 2nd ed. Science Publishers. USA. 388 p.
- Rodrigues L. A., V. B. D Paiva, A. G. Boaretto, J.F.D. Oliveira, M. D. A. Torrezan, S. F. D. Lima y W. C. Otoni (2015)**. Propagación *in vitro* de *Cyrtopodium saintlegerianum* rchb. f. (orchidaceae), una orquídea nativa de la sabana brasileña. *Mejoramiento de cultivos y biotecnología aplicada* 15:10-17.
- Rodríguez L., González, R., Alvarado, K., Telles, E. (2007)** Germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de orquídeas silvestres. *Biotechnol. Veg.* 7.
- Rodríguez M., M. Chacón, R. Carrillo (2014)** Efecto de la concentración y de los componentes del medio de cultivo MS sobre la germinación *in vitro* de *Ugni molinae*. *Bosques* 35: 119-122.
- Rojas G. V. (2016)** El cultivo de tejidos vegetales: una biotecnología poderosa y prometedora. *Revista Innovación Agrícola* 1:1.
- Röllke F. (2008)** Orquídeas rápido y fácil. München, Alemania: Hispano Europea
- Rout G. R., A. Mohapatra, and J. S. Mohan (2006)** Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances* 24: 531-560.
- Sáenz L, G. Herrera-Herrera, F. Uicabballote, J. L. Chan and C. Oropeza (2010)** Influence of form of activated charcoal on embryogenic callus formation in coconut (*Cocos nucifera*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 100: 301-308.
- Salazar-Cerezo S., N. Martínez-Montiel, J. García-Sánchez, R. Pérez-y-Terrón, R. D. Martínez-Contreras (2018)** Gibberellin biosynthesis and metabolism: A convergent route for plants, fungi and bacteria. *Microbiol Res* 208:85-98.
- Salazar-Mercado S. (2012)** Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombrain (Orchidaceae). *Acta Agronómica* 61: 69-78.

- Salgado J. y L. Peñaranda (2018)** Modificaciones en medios de cultivo aplicadas en conservación y producción *in vitro* de orquídeas. Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales. 6:17-28.
- Sampathkumar A. (2020)** Regulación mecánica por bucle de retroalimentación de la morfogénesis en plantas. Desarrollo 147:16
- Sampayo-Maldonado, S., C. R. Castillo-Martínez, M. Jiménez-Casas, V. Sánchez-Monsalvo, J. Jasso-Mata y J. López-Upton (2017).** Germinación *in vitro* de semillas de *Cedrela odorata* L. de genotipos extintos. *Agroproductividad*, 10(8), 53-58.
- Sarmiento F.M. y C. Romero G. (2000)** Orquídeas Mexicanas. Banobras-Porrúa. México, D.F. 145 p
- SAS Institute (2013)** The SAS System for Windows. Release 9.4. SAS Institute Inc. Cary. N.C., USA.
- Schneiders D. E., R. Pescador, M. R. Booz e R. M. Suzuki (2012)** Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya spp.*, Orchidaceae). Revista Ceres 59:185-191.
- Schwarz O. J y R. M. Beaty (2018)** Organogénesis. En Conceptos de cultivo de tejidos vegetales y ejercicios de laboratorio 125-138.
- Seaton, P. and M. Ramsay (2005)** Growing orchids from seeds. Royal Botanical Garden, Kew. London, England.
- Seelye J.F., G. K. Burge, E. R. Morgan (2003)** Acclimatizing Tissue Culture Plants: Reducing the Shock. Combined Proceedings International Plant Propagators Society 53: 85-90.
- Segretín M. E. (2011)** Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). Recuperado el 3 de febrero de 2014 desde <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20II%20Euge.pdf>
- Segretín M.E. (2006)** Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). Cons. Argent. Para Inf. El Desarro. Biotecnol.
- SEMARNAT (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales) (2010)** Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección Ambiental-Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestres-Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio-Lista de Especies en Riesgo. Diario Oficial de la Federación 30 diciembre, 2010. http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM_059_SEMARNAT_2010.
- Sharry S. (2015)** Plantas de probeta. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). 120 p.

- Silva C. D. S., L. G. D. Araújo, K. C. I. Sousa, D. M. Silva, S. T. Sibov e P. R. Faria (2017)** Germinação e desenvolvimento *in vitro* de orquídea epífita do Cerrado. *Ornamental Horticulture* 23:96-100.
- Sipayung P., J. Matanari, M. B. Lafau, Y. S. Sulastri, B. B. Ginting, D. R. Sihombing, ... y T. Giawa (2018)** El efecto de la dosis de carbón activado y la concentración de bencil amino purina sobre el crecimiento de plántulas de orquídeas en medios Murashige y Skoog *in vitro*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 205, p. 012025.
- Smith R. (2013)** Plant tissue culture. 3ra. ed. Elsevier, India. 208 p.
- Solano R., R. Bello y A. Vásquez (2007)** “Listado de las Orquídeas de la Región de Juquila, Oaxaca, México”. *Naturaleza y desarrollo*. 5:5-15
- Solano-Gómez R., N. Alonso-Hernández, K. Rosado-Ferrer, M. de A. Aguilar-Hernández, R. García (2008)** Diversidad, distribución y estrategias para la conservación de las Pleurothallidinae (Orchidaceae) en Oaxaca. *Bol. Soc. Botánica México* 41–52.
- Soto-Arenas M. A. (1996)** Orchid Specialist Group. Orchids status survey and conservation action plan. IUCN, Gland y Cambridge. Regional Accounts: Mexico. pp. 53-58.
- Soto-Arenas M. A., E. Hágsater, R. Jiménez, G. A. Salazar, R. Solano, R. Flores y I. Ruiz (2007)** Orchids of Mexico: Digital catalogue. Instituto Chinoín. Mexico, D.F.
- Soto-Arenas M. y G. Salazar (2004)** Orquídeas. Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología, UNAM, Fondo para la Conservación de la Naturaleza, WWF, México pp. 271-295.
- Soto-Arenas M., R. Solano-Gomez, E. Hágsater (2015)** Risk of extinction and patterns of diversity loss in Mexican orchids. *Lankesteriana* 7. doi:10.15517/lank.v7i1-2.18449
- Stewart S.L., M. E. Kane (2006)** Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 86:147-158.
- Suárez L. (2007)** Efecto que ejercen las aspersiones foliares de una mezcla de oligogalacturónidos (Pectimorf) y la formulación a base de un análogo de brasinoesteroides (Biobras-16) en dos especies de orquídeas (*Cattleya leuddemmanniana* y *Guarianthe skinneri*). *Cultivos Tropicales* 28:87-91.
- Suárez O.M., E. J. Naranjo G., Atehortúa Garcés, L., Blair Trujillo, S., (2011)** Organogénesis directa *in vitro* a partir de hojas de la planta Antiplasmodial *Solanum nudum* Dunal. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 13:186–192.

- Téllez V. M. A. (2011)** Análisis del diagnóstico de la familia Orchidaceae en México. Universidad Autónoma Chapingo. México. 174 p
- Thorpe T. A. (2007)** History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* 37:169-180.
- Thorpe T. A. y E. C. Yeung (2011)** Plant Embryo Culture: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology* 710.
- Tian H. Y. Xu, S. Liu, D. Jin, J. Zhang and L. Duan (2017)** Synthesis of gibberellic acid derivatives and their effects on plant growth. *Molecules* 22:2-11.
- Torre-González C. D. (2017)** Physiological and molecular bases of the seasonal growth of *Pinus Pinaster* Aiton.
- Torres-Zúñiga M. M. y E. M. Aguirre-León (2001)** Micropropagación aplicada a la conservación ex situ de *Epidendrum longipetalum* (Orchidaceae). XV Congreso Mexicano de Botánica. Resumen de cartel.
- Trejo-Tellez L. I., G. Alcantar G. (2010)** Nutrición de cultivos. Colegio de Postgraduados. 454 p.
- Vacin F., Went F.W. (1949)** Some pH changes in nutrient solutions. *Bot. Gaz.* 110: 605-613.
- Veltcheva M. R., and D. L. Svetleva (2005)** *In vitro* regeneration of *phaseolus vulgaris* via organogenesis from petiole explants. *Journal of Central European Agriculture* 6:53-58, <https://hrcak.srce.hr/16830>.
- Vera T. R. H. M (2020)** Optimización de protocolos para la aclimatación de plántulas de orquídeas provenientes de cultivo *in vitro*. Universidad Nacional de San Martín. Perú. <http://hdl.handle.net/11458/3824>
- Vij S.P., J. K. Sembi, J. Verma (2004)** *In vitro* rapid mass multiplication of *Aerides multiflora*, a floriculturally significant species. *Journal Orchid Society* 17:63–68.
- Villafuerte S. A. (2013)** Micropropagación de *Barkeria whartonia* y *Barkeria scandens* (Orchidaceae), especies mexicanas en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 151 pp.
- Villarreal B. (2015)** ¿Cómo se forman las nuevas plantas *in vitro*?: morfogénesis *in vitro*. Organogénesis. Embriogénesis somática. Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires, Argentina. pp: 92-101.
- Villaseñor J. L. (2010)**. El Bosque húmedo de montaña en México y sus plantas vasculares: Catálogo Florístico-Taxonómico. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad; Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., México. 38 pp.

- Wang M. R., M. Lambardi, F. Engelmann, R. Pathirana, B. Panis, G. M. Volk and Q. C. Wang (2021)** Avances en la criopreservación de propágulos derivados *in vitro*: tecnologías y fuentes de explantes. Cultivo de células, tejidos y órganos vegetales (PCTOC) 144:7-20.
- Weber W.S and J. Webster (2001)** Teaching techniques for mycology: Mycorrhizal infection of orchid seedlings in the laboratory. *Mycologist* 15:2.
- Withner C. (1998)** *Sobralia citrina*. AOS Bulletin. 72:6
- Withner C. and R. Krieger (1985)** The Orchids. Scientific Studies. Publishing Company. Florida. USA. p 224-245.
- Yam T. W. and J. Arditti (2017)** Micropropagación de orquídeas.
- Yoder J.A., L. W. Zettler and S. L. Stewart (2000)** Water requirements of terrestrial and epiphytic orchids seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. *Plant Science*. 156:145-150.
- Yuan Z.L., Y. C. Chen and Y. Yang (2009)** Diverse non-mycorrhizal fungal endophytes inhabiting an epiphytic, medicinal orchid (*Dendrobium nobile*): estimation and characterization. *World Journal Microbiology Biotechnology* 25:295– 303.
- Zotz G. (2013)** The systematic distribution of vascular epiphytes—a critical update. *Botanical Journal Linnean Society* 171:453-481.

APÉNDICE

Cuadro A.1. Composición química del medio basal MS (Murashige y Skoog (1962)).

Macronutrientes (mg L ⁻¹)	Sales Inorgánicas		Compuestos Orgánicos (mg L ⁻¹)		
		Micronutrientes (mg L ⁻¹)			
NH ₄ NO ₃	1,650	KI	0.83	Inositol	100
KNO ₃	1,900	H ₃ BO ₃	6.2	Ácido Nicotínico	0.05
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3	Piridoxina.HCl	0.5
MgSO ₂ .7H ₂ O	370	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	Tiamina. HCl	0.1
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	Glicina	2
		CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	Sacarosa	
		CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025		3%
		FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8		
		Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.3		

Cuadro A.2. Cuadrados medios y su significancia del análisis del número y longitud de los brotes en la inducción *in vitro* de *P. vitellina* después de ocho semanas de cultivo

Fuente de Variación	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)
MS+BA+ANA * MS+BA+AIA	2.02 *	1.19 *
Error	0.59	0.13
C. V.	47.43	36.05
R ²	0.11	0.16
Media	1.62	1.02

*=Significativo (p≤0.05); NS= No significativo; C.V.= Coeficiente de variación

Cuadro A.3. Cuadrados medios y su significancia del análisis de número y altura de brotes en el alargamiento *in vitro* de *P. vitellina* después de ocho semanas de cultivo

Fuente de Variación	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)
Concentración MS * Carbón activado	3.38*	2.156
Error	1.06	0.27
C. V.	39.21	27.93
R ²	0.18	0.18
Media	2.63	1.86

*=Significativo ($p \leq 0.05$); NS= No significativo; C.V.= Coeficiente de variación

Cuadro A.4. Cuadrados medios y su significancia del análisis de la brotación, longitud y número de brotes en la multiplicación *in vitro* de *P. vitellina* después de ocho semanas de cultivo.

Fuente de Variación	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Brotación (Núm.)
BA+ANA *BA+AIA	2.5	1.63	1.00
Error	0.94	0.22	0.07
C. V.	52.77	41.06	29.41
R ²	0.21	0.24	0.17
Media	1.84	1.14	0.91

*=Significativo ($p \leq 0.05$); NS= No significativo; C.V.= Coeficiente de variación

Cuadro A.5. Cuadrados medios y su significancia del análisis de número de raíces en el enraizamiento *in vitro* de *P. vitellina* después de cuatro y ocho semanas de cultivo.

Tiempo	Fuente de Variación	Número de raíces	Enraizamiento (Núm)
4 Semanas	AIB*AIA*ANA	2.93	0.83
	Error	4.30	0.22
	C. V.	101.36	70.36
	R ²	0.13	0.12
	Media	2.04	0.67
8 Semanas	AIB*AIA*ANA	5.26	0.90
	Error	8.30	0.14
	C. V.	68.60	46.36
	R ²	0.13	0.14
	Media	4.2	0.82

*=Significativo ($p \leq 0.05$); NS= No significativo; C.V.= Coeficiente de variación

Cuadro A.6. Cuadrados medios y su significancia del análisis de supervivencia a las cuatro y ocho semanas de cultivo.

Tiempo	Fuente de Variación	Supervivencia (Núm)
4 Semanas	Sustrato * tamaño de planta	1.00
	Error	0.09
	C. V.	35.19
	R ²	0.50
	Media	0.85
8 Semanas	Sustrato * tamaño de planta	1.00
	Error	0.13
	C. V.	47.39
	R ²	0.52
	Media	0.75

*=Significativo ($p \leq 0.05$); NS= No significativo; C.V.= Coeficiente de variación