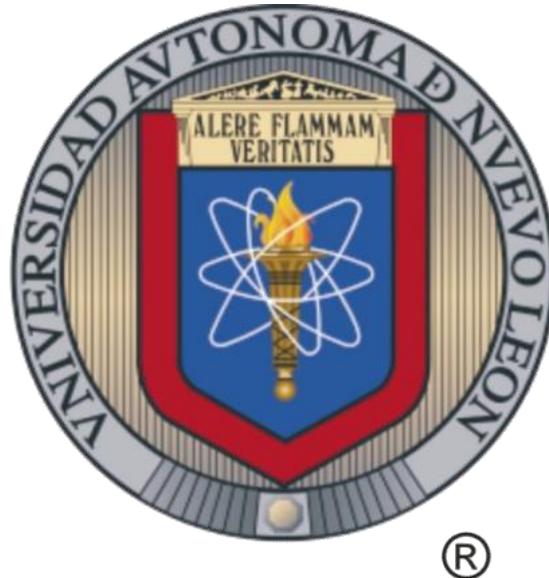


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



TESIS

**MORFOGÉNESIS *in vitro* EN LAS ORQUÍDEAS *Phalaenopsis* spp.
(Blume) Y *Cattleya* sp. (Lindley)**

PRESENTA

QBP KARLA ANDREA FRAUSTO JAIME

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

SEPTIEMBRE, 2017

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



TESIS

**MORFOGÉNESIS *in vitro* EN LAS ORQUÍDEAS *Phalaenopsis* spp.
(Blume) Y *Cattleya* sp. (Lindley)**

PRESENTA

QBP KARLA ANDREA FRAUSTO JAIME

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

GENERAL ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO

SEPTIEMBRE, 2017

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



TESIS

**MORFOGÉNESIS *in vitro* EN LAS ORQUÍDEAS *Phalaenopsis* spp.
(Blume) Y *Cattleya* sp. (Lindley)**

PRESENTA

QBP KARLA ANDREA FRAUSTO JAIME

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

GENERAL ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO

SEPTIEMBRE, 2017

ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL
COMITÉ PARTICULAR COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

COMITÉ PARTICULAR

Dra. Ma. Del Carmen Ojeda Zacarías
Director

M.C. Eduardo A. García Zambrano
Co-Director

Dr. Omar G. Alvarado Gómez
Asesor

Dra. Adriana Gutiérrez Díez
Subdirectora de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA

Dedico este trabajo y con mucho cariño a mi familia quienes siempre me han apoyado, ellos son el motor que me impulsa a seguir adelante.

También se lo dedico a todos aquellos en quienes surja el interés por el cultivo de orquídeas, porque la belleza de sus flores es un reflejo de su largo camino en la lucha por subsistir, y no debe pasar desapercibido.

“No os dejéis corromper por un escepticismo estéril y deprimente; no os desalentéis ante la tristeza de ciertas horas que pasan sobre las naciones. Vivid en la serena paz de los laboratorios y de las bibliotecas. Preguntaos primero ¿ Qué he hecho por instruirme? Y después, a medida que vayáis progresando: ¿Qué he hecho por mi patria? Hasta que llegue el día en que podáis tener la íntima satisfacción de pensar en que habéis contribuido de alguna manera al progreso y al bienestar de la humanidad ”

Louis Pasteur (1822 - 1895)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a mi esposo Martín Reyna Zúñiga, porque su crítica objetiva y apoyo incondicional me ayuda a mejorar siempre en todos los aspectos.

Agradezco también a todos mis maestros y compañeros de posgrado por compartirme su experiencia en el área agronómica.

Debo dar las gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca para la manutención durante mis estudios de posgrado.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
NOMENCLATURAS	xv
RESUMEN	xviii
SUMMARY.....	xx
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis.....	3
1.1.1 Hipótesis específicas	3
1.2 Objetivo General.....	3
1.2.1 Objetivos específicos	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1 Generalidades de las Orquídeas.....	5
2.1.1 Historia y Origen	6
2.1.2 Distribución Geográfica y Hábitat	10
2.1.3 Clasificación Taxonómica y Evolución.....	13
2.1.4 Descripción Botánica	16
2.1.5 Usos e Importancia Económica	27
2.2 Propagación Tradicional de Orquídeas.....	33
2.2.1 Condiciones Generales de Cultivo.....	33
2.2.2 Propagación de <i>Phalaenopsis</i>	34
2.2.3 Propagación de <i>Cattleya</i>	35
2.3 Cultivo de Tejidos Vegetales.....	37
2.3.1 Antecedentes Históricos	38
2.3.2 Descripción de la Técnica.....	39

2.3.3 Condiciones de Cultivo	40
2.3.4 Micropropagación	43
2.4 Micropropagación de Orquídeas.....	46
2.4.1 El Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Phalaenopsis</i>	46
2.4.2 El Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Cattleya</i>	47
2.5 Diseño Experimental en la Experimentación <i>In Vitro</i>	48
3. MATERIALES Y MÉTODOS	50
3.1 Ubicación Geográfica	50
3.2 Material de Estudio	51
3.3 Estudio <i>Phalaenopsis</i>.....	55
3.3.1 Obtención de Explantes.....	55
3.3.2 Establecimiento Aséptico.....	55
3.3.3 Medio de Cultivo.	57
3.3.4 Diseño Estadístico.	58
3.4 Estudio <i>Cattleya</i>.....	59
3.4.1 Obtención de Explantes.....	59
3.4.2 Establecimiento <i>In Vitro</i>	59
3.4.3 Medio de Cultivo	59
3.4.4 Diseño Estadístico	60
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
4.1 Estudio <i>Phalaenopsis</i>.....	62
4.1.1 Experimento de Sales Minerales	62
4.1.2 Experimento de Organogénesis	67
4.2 Estudio <i>Cattleya</i>.....	71
4.2.1 Oxidación	71
4.2.2 Morfogénesis	75
5. CONCLUSIONES	87
6. RECOMENDACIONES.....	89
7. BIBLIOGRAFÍA	91

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1. Importación registrada de Orquidaceae hybrid en 2013 †.....	29
Cuadro 2.2. Importación registrada de Orchidaceae spp. en 2013 †.....	30
Cuadro 2.3. Exportación registrada de Orchidaceae spp. en México en 2013 †.....	32
Cuadro 2.4. Componentes de algunos medios de cultivo para células y tejidos vegetales (Tomado de Calva y Pérez, 2005).....	42
Cuadro 4.1 Porcentaje de oxidación de explantes por medio de cultivo.	63
Cuadro 4.2. Porcentaje de oxidación de explantes por variedad de <i>Phalaenopsis</i>	65
Cuadro 4.3. Porcentaje de inducción de explantes y número de brotes por explante de acuerdo al regulador de crecimiento empleado en <i>Phalaenopsis</i>	67
Cuadro 4.4. Oxidación correspondiente a cada tipo de regulador de crecimiento.....	72
Cuadro 4.5. Porcentajes de oxidación correspondiente a cada regulador de crecimiento de acuerdo a la concentración.....	73

Cuadro 4.6. Porcentajes de oxidación correspondiente a cada regulador de crecimiento de acuerdo a la posición de la hoja.....	74
Cuadro 4.7. Morfogénesis correspondiente a cada tipo de regulador de crecimiento.....	78
Cuadro 4.8. Porcentajes de morfogénesis correspondiente a cada regulador de crecimiento de acuerdo a la concentración.....	80
Cuadro 4.9. Porcentajes de morfogénesis correspondiente a cada regulador de crecimiento de acuerdo a la posición de la hoja.	82
Cuadro 4.10. Porcentajes de morfogénesis correspondientes a los reguladores que muestran correlación en alguna concentración con la posición de la hoja.	82
Cuadro 4.11. Número de brotes por explante con respuesta de acuerdo al regulador empleado.	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 2.1. Mapa de distribución general de orquídeas epífitas y terrestres de acuerdo a la latitud (Tomado y modificado de espanol.mapsofworld.com).. 12

Fig. 2.2. Árbol filogenético de las sub-familias Orchidaceae a la izquierda. A la derecha mapas de distribución de las sub-familias, a) Apostasioideae, b) Vanilloideae, c) Cyripedioideae, d) Orchidoideae, e) Epidendroideae. Tomado y modificado de Stevens, 2001..... 16

Fig. 2.3. Izquierda: Crecimiento simpodial en *Oncidium* spp.(Tomado de Bateman, 1895). Centro: Crecimiento monopodial en *Phalaenopsis* spp.(Tomado de Espinosa et al., 2009). Derecha: Crecimiento trepador en *Vanilla* spp.(Tomado de <https://norfipc.com/fotos/cuba/campechal/planta-orquidea-vanilla.jpeg>)..... 17

Fig. 2.4. Partes principales de la flor. 1a) sépalo dorsal; 1) sépalos laterales; 2a) labelo; 2) pétalos; 3) columna. 19

Fig. 2.5 Izquierda: cápsulas abiertas con semillas expuestas de *Phalaenopsis* a la izquierda y *Cattleya* a la derecha (Tomado de www.orquideoteca.blogspot.com)..... 23

Fig. 2.6. Ilustraciones de *Phalaenopsis amabilis* a la izquierda y *Cattleya labiata* a la derecha..... 27

Fig. 3.1 Campus Marín de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Imágenes © 2016 DigitalGlobe, Texas Orthoimagery Program, USDA Farm Service Agency, Datos del mapa © 2016 Google). Vista frontal del Laboratorio.	50
Fig. 3.2 a) orquídea blanca, b) orquídea rayada, c) orquídea rosa y d) orquídea amarilla.	52
Fig. 3.3 Dendograma de 16 especies e híbridos de <u>Phalaenopsis</u> generado con los datos del AFLP usando el coeficiente de Dice (S_D) de similitud genética. Tomado de Chang y Veilleux, 2009).	54
Fig. 3.4 Plántulas de <u>Cattleya in vitro</u> propiedad del Laboratorio de Biotecnología de la FAUANL. a) Plántulas muy pequeñas con poco desarrollo foliar y radicular, se observa variación en el desarrollo, b) y c) plántulas con mayor desarrollo foliar seleccionadas para el experimento.	55
Fig. 3.5. Varas florales de <u>P. amabilis</u> completas a la izquierda y segmentadas y sin brácteas a la derecha.	56
Fig.3.6. Establecimiento en condiciones asépticas. Izquierda: equipo dispuesto dentro de la campana de flujo laminar; centro: segmentos trasladados a la campana de flujo laminar; derecha: explantes listos en agua destilada estéril.....	56
Fig.3.7. Establecimiento in vitro de los segmentos de varas florales en los medios de cultivo.	57
Fig. 3.8. Segmentos de hojas establecidos en los medios de cultivo. A la izquierda las hojas se encuentran colocadas con el haz tocando el medio de cultivo, a la derecha el envés es el lado que toca el medio.	59

Fig. 4.1 Oxidación de explantes. Izquierda: Yema que presenta oxidación; centro: yema que se considera viable; derecha: compuestos fenólicos liberados al medio de cultivo 63

Fig. 4.2. Inducción de brotes en yemas de varas florales de *P. amabilis*. Arriba: brotes obtenidos a las 8 semanas después del establecimiento; abajo: brotes obtenidos a las 16 semanas después del establecimiento. 69

Fig. 4.3. Yemas florales establecidas. Izquierda: yema durmiente del extremo superior de la vara floral; centro: yemas activas del centro de la vara floral; derecha: yema apical de la vara floral. 70

Fig. 4.4. Oxidación de explantes. Izquierda: hoja que presenta oxidación; centro: hoja que se considera viable; derecha: compuestos fenólicos liberados al medio de cultivo 71

Fig. 4.5. Cortes histológicos de diferentes explantes cultivados in vitro. A: meristemoides (flechas) observados en cultivo de *Silybum marianum* L. en MS + 1 mg l⁻¹ de I mg l⁻¹ de B P 1 x ; C: grupo de células embriogénicas (flechas) en *Codiaeum variegatum* (L) Blume cultivados en 1 mg l⁻¹ de tidiazurón. 20 x . Tomado y modificado de Radice (2010). 76

Fig. 4.6. Brotes formados de novo en la parte basal de hojas jóvenes.... 77

Fig. 4.7. Primordios foliares en brotes formados de novo en explantes de hojas jóvenes. Arriba a la izquierda los brotes se han separado del explante. . 79

Fig. 4.8. Explante de hoja joven mostrando la parte basal de la hoja del grupo control al final del experimento. Obsérvese la oxidación y ensanchamiento del tejido pero ningún brote..... 81

Fig. 4.9. Brotes completamente diferenciados de la sección de hoja de donde surgieron, muestran un primordio foliar sin embargo aún no se distingue el primordio radicular.....83

Fig. 4.10. A la izquierda Primordio foliar de uno de los brotes nuevos. Se puede notar alrededor la formación del velamen. Al centro y a la derecha Pelos radicales que sirven para absorción de nutrientes pero aún no se diferencia la raíz, también se aprecia el ápice foliar.83

Fig. 4.11. . Brotes obtenidos de novo a partir de hojas jóvenes. Se puede notar aún los vestigios de las hojas que fueron establecidas.....84

Fig. 4.12. Plántulas regeneradas in vitro a partir de hojas jóvenes obtenidas a los cuatro meses de su establecimiento.....86

NOMENCLATURAS

2,4-D	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
2iP	2-isopenteniladenina
AIA	Ácido indolacético
AIB	Ácido indol-3-butírico
ANA	Ácido 1-naftalenacético
ANITA	Amborella-Nymphaeales-Illiciales- Trimeniaceae-Austrobaileya
APG	Angiosperm Phylogeny Group
APWeb	Angiosperm Phylogeny Website
Aux	Auxina
BAP/ANA	6-Bencilaminopurina/ Ácido 1-naftalenacético
BAP	6-Bencilaminopurina
CAM	Crassulacean Acid Metabolism
Cit	Citocinina
CITES	Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora
Dicamba	Ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico
EOL	Encyclopedia of Life

FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
GBIF	Global Biodiversity Information Facility
ITIS	Integrated Taxonomic Information System
KIN/AIA	Kinetina/ Ácido indolacético
KIN	Kinetina
MNH	Museum of Natural History
MS	Murashige y Skoog
NOA	Ácido B-naftoxiacético
NOM	Norma Oficial Mexicana
NPK	Nitrógeno-Fósforo-Potasio
Picloram	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico
REDBIO	Red de Cooperación Técnica en Biotecnología Vegetal
SIAP	Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SINAREFI	Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura
Thidiazuron	1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)urea
Tween-20	Polisorbato 20
UMA	Unidad de Manejo Ambiental

ZEA	Zeatina
μmol	Micromol
mg	Miligramo
g	Gramo
Kg	Kilogramo
mL	Mililitro
L	Litro
s	Segundo
min	Minuto
hr	Hora
m.a.	Millones de años
cm	Centímetro
a.e.c.	Antes de la Era Cristiana

RESUMEN

Las orquídeas son plantas con alto potencial ornamental debido a la gran admiración que causa la diversidad en color, forma y aroma de sus flores, sin embargo, su propagación tradicional requiere periodos de tiempo prolongados, además que la constante cruza ha incrementado la esterilidad de sus híbridos. El cultivo de tejidos vegetales permite obtener orquídeas sanas en cortos periodos de tiempo que pueden ser propagadas masivamente para cubrir la demanda comercial.

El objetivo del estudio fue inducir la formación de brotes *in vitro* en los explantes de las orquídeas *Phalaenopsis* spp. y *Cattleya* sp.

Se establecieron asépticamente yemas florales de *Phalaenopsis* spp. evaluando cuatro formulaciones de sales minerales (MS al 100%, MS al 50%, Knudson y Fertilizante NPK 18-9-18/15-30-15), y buscando la organogénesis se evaluaron los reguladores de crecimiento Bencilaminopurina y Ácido naftalenacético. Se emplearon hojas de plántulas *in vitro* de *Cattleya* sp. buscando la formación de brotes en el haz y el envés de las hojas, con cuatro concentraciones de tres auxinas (Ácido indolacético, Ácido naftalenacético, Ácido 2,4 diclorofenoxiacético), tres citocininas (Bencilaminopurina, Zeatina, Kinetina) y dos combinaciones de citocinina/auxina.

El medio MS 50% resulta la mejor opción para mantener la viabilidad de las yemas florales de *Phalaenopsis* y se obtiene mayor inducción de brotes con la combinación de BAP/ANA.

La organogénesis en hojas de *Cattleya* se alcanza con mejores resultados en las combinaciones de BAP/ANA, KIN/AIA, y el tratamiento con BAP. Mientras que el mayor número de brotes se obtiene con los tratamientos con ZEA y la combinación BAP/ANA.

Palabras clave: Potencial ornamental, Cultivo de tejidos vegetales, Organogénesis, *Phalaenopsis*, *Cattleya*

SUMMARY

Orchids are plants with high ornamental potential due to the great admiration that causes diversity in color, form and aroma of their flowers, however, their traditional propagation requires long periods of time, in addition the constant cross has increased the sterility of their hybrids. The plant tissues culture allows healthy orchids to be obtained in short periods of time that can be massively propagated for cover commercial demand.

The objective of the study was to induce the formation in vitro shoots in the explants of *Phalaenopsis* spp. and *Cattleya* sp. orchids.

Phalaenopsis spp. flower buds were aseptically established. Evaluating four formulations of mineral salts (100% MS, 50% MS, Knudson and NPK Fertilizer 18-9-18 / 15-30-15), and looking for organogenesis the growth regulators Bencilaminopurine and Naphthaleneacetic Acid were evaluated. *In vitro* seedling leaves of *Cattleya* sp. looking for the formation of shoots in the bundle and the back of the leaves, with four concentrations of three auxins (indoleacetic acid, naphthaleneacetic acid, 2,4 dichlorophenoxyacetic acid), three cytokinins (Bencilaminopurine, Zeatin, Kinetin) and two Cytokinin / Auxin.

The 50% MS medium is the best option to maintain the viability of the *Phalaenopsis* flower buds and the highest shoots induction is obtained with the BAP / ANA combination.

Cattleya leaf organogenesis is best achieved in combinations BAP/ANA, KIN/AIA, and BAP treatment. While the highest number of shoots is obtained with the treatments with ZEA and the BAP/ANA combination.

Keywords: Ornamental potential, Plant tissue culture, Organogenesis, *Phalaenopsis*, *Cattleya*

1. INTRODUCCIÓN

Las orquídeas se conocen desde hace miles de años y desde entonces han tenido gran valor para el ser humano. En la actualidad son apreciadas alrededor de todo el mundo como plantas de ornato debido a sus flores, que es la parte más llamativa la cual presenta una gran variedad de formas, colores y aromas; estas características les otorgan una alta demanda comercial para ser utilizadas en todo tipo de arreglos florales o para su venta como planta de interior.

La orquídea mariposa es uno de los géneros más apreciados a nivel mundial por el colorido, forma, variedad y duración de sus flores; sin embargo su reproducción sexual se ha visto afectada por la esterilidad de algunos de sus híbridos relacionada con los extensivos trabajos de hibridación en este género. Por otro lado, la orquídea *Cattleya* es uno de los géneros más elegantes y preferidos en América Central y Sudamérica, siendo varias especies la flor nacional de algunos países de Latinoamérica, sin embargo su propagación natural demanda mucho tiempo, ya que su crecimiento es muy lento lo que eleva los costos de su comercialización; además que sus especies se ven afectadas por la extracción ilegal de sus hábitats naturales. Debido a estas problemáticas surge la necesidad de aplicar nuevas tecnologías para la propagación de estas orquídeas.

El cultivo de tejidos vegetales representa una alternativa para disminuir el tiempo de regeneración e incrementar las poblaciones para su comercio, a través de

técnicas de propagación *in vitro*, con las cuales se puede determinar la capacidad organogénica y embriogénica, que a su vez son específicas de cada especie. Con dicho propósito se trabajó con explantes de las orquídeas *Phalaenopsis* y *Cattleya* adentrándonos en la multiplicación *in vitro* para proporcionar nuevos datos sobre los que se pueda seguir avanzando en su micropropagación y de esta manera contribuir a la producción nacional de estas bellas plantas.

En la industria ornamental de orquídeas son pocos los países que cubren la demanda global, México puede ingresar a este mercado, puesto que cuenta con los climas apropiados para el desarrollo de diversas especies, a pesar de ello existen pocos invernaderos dedicados al cultivo de orquídeas en el país. Siendo así, se ha realizado un gran esfuerzo, mediante el cultivo *in vitro*, en asegurar la propagación y conservación de especies endémicas, pero hay pocos resultados para las especies con potencial comercial.

Actualmente existen pocas empresas nacionales que provean los requerimientos de plántulas para los invernaderos existentes en nuestro país, por lo que la gran mayoría de los productores recurren a empresas extranjeras que aseguran un constante suministro de plantas con ciertos criterios de calidad. Impulsar nuevas biotecnologías en la producción de estas flores en México puede contribuir a la generación de nuevos empleos, el incremento de su producción, y la disminución en la importación y dependencia hacia el extranjero, creando una productividad rentable, que además se puede aplicar a especies endémicas, lo cual reduciría la extracción de orquídeas de sus hábitats naturales.

1.1 Hipótesis

La organogénesis en las orquídeas *Phalaenopsis* spp. y *Cattleya* sp. se obtiene cuando se establecen sus explantes en el medio de cultivo adecuado y con un correcto balance hormonal, por lo tanto, la atención a factores como la combinación e interacción de los reguladores de crecimiento, y sus concentraciones durante el cultivo de sus tejidos, permitirá la multiplicación clonal *in vitro* de estas orquídeas.

1.1.1 Hipótesis específicas

- ✿ La metodología de desinfección permitirá el establecimiento aséptico *in vitro* de los explantes de la orquídea mariposa.
- ✿ Las sales minerales del medio de cultivo permitirán que los explantes establecidos permanezcan viables.
- ✿ Los reguladores de crecimiento y sus concentraciones inducirán la formación de brotes en los explantes de ambas orquídeas.

1.2 Objetivo General

Inducir la formación de brotes *in vitro* en los explantes de las orquídeas *Phalaenopsis* spp. y *Cattleya* sp.

1.2.1 Objetivos específicos

- ✿ Establecer asépticamente los explantes de la orquídea mariposa en condiciones *in vitro*.
- ✿ Determinar el medio de cultivo adecuado para los explantes establecidos de la orquídea *Phalaenopsis*.

🌸 Evaluar la organogénesis *in vitro* con diferentes reguladores de crecimiento y diferentes concentraciones en los explantes de ambas orquídeas.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

Para poder dejar asentada la necesidad de esta tesis debemos primero hacer referencia a nuestro objeto de estudio, la orquídea. Esta hermosa planta pertenece a una familia con una gran diversidad en sus géneros así como con diferencias entre especies; es por ello que la descripción de sus características se hace de manera general enfatizando algunas peculiaridades de los géneros a los que compete este ensayo.

Es importante recordar que las plantas ornamentales han estado presentes en la vida diaria de nuestra sociedad, formando parte de la cosmovisión del mundo ya sea con un significado religioso, por su relación con la naturaleza o por el embellecimiento del entorno. En la actualidad, constituyen una oferta de productos representada por plantas de maceta, árboles, follajes, y flores de corte que conforman el perfil del sector ornamental (Espinosa, 2009).

2.1 Generalidades de las Orquídeas

Las orquídeas han fascinado a la humanidad desde sus inicios, aunque en la actualidad el principal responsable del aprecio hacia estas plantas es su gran atractivo estético, han sido para los hombres a lo largo de su historia símbolo de amor, sexualidad y belleza.

2.1.1 Historia y Origen

Hace 83 - 75 millones de años, en la era Mesozoica, a finales del periodo Cretácico, se originaron las primeras orquídeas, por lo que han tenido tiempo suficiente para evolucionar y adaptarse a sus hábitats generando en el proceso las bellas flores que conocemos en la actualidad (Campbell, 2013).

Si bien los seres homínidos caminaron en la era Cenozoica desde el periodo Neógeno, en la época del Mioceno hace aproximadamente 7 mil millones de años, no se tiene ningún registro de algún tipo de apreciación hacia las orquídeas por el ser humano sino hasta la época del Holoceno, habiéndose encontrado escritos con alrededor de 1500 años de antigüedad en los que se hace referencia al cultivo de orquídeas (Coronado y Soto, 2004).

Aunque en Grecia se les asignó el nombre relacionado al que ahora conocemos, el cual nada se relaciona con lo vistoso de sus flores, fueron descritas anteriormente en China. El filósofo oriental Confucio (551 – 479 a.e.c.) describió a “*lan*” (nombre con el que se refería a las orquídeas) como “la reina de las plantas fragantes”, y comparaba al hombre virtuoso con las orquídeas mostrando su ética, moral, rectitud y carácter orgulloso; desde entonces, las orquídeas han sido parte de la cultura china permaneciendo en su historia, medicina tradicional, leyendas, literatura, y arte (Chenglei, 2006; MNH, 2011).

Hubieron de pasar algunos años para que el filósofo griego Theophrastus (371-285 a.e.c..) las describiera en su manuscrito “*De Historia Plantarum*”, en el que se refiere a algunas orquídeas del Mediterráneo como “plantas con dos tubérculos redondeados” haciendo referencia a los pseudobulbos, los cuales se “asemejaban a la forma de los testículos de los perros” por lo que las llamó en griego “*όρχις*”, que

significa testículo y cuya derivación en latín es “*orchis*” (Barba *et al.*, 2002; Tiza, 2010).

Para entonces ya contaba la humanidad con una descripción botánica de estas plantas que habían sido primeramente una fuente de su inspiración, pero en el siglo I el griego Dioscorides, en su libro “Acerca de la materia medicinal y de los venenos mortíferos”, menciona costumbres sobre el consumo de orquídeas como el Compañón del perro (llamado *Cynosorchis* y *Testiculus* en latín, y el *Satyrium*, orquídeas que se creía tenían la cualidad de poder influir en la sexualidad del hombre determinando el sexo de la progenie, incitando o reprimiendo la virtud genital, al consumir el bulbo del rizoma mezclado con leche de cabra o vino o incluso con solo sostener la raíz bulbosa en la mano, haciendo explícitas las propiedades afrodisiacas de la planta (Dioscorides, 1555; Jarava, 2005).

Teoría que sería aceptada por los siguientes 16 siglos en los que se creía que estas plantas afrodisíacas incrementaban la sexualidad masculina e inclusive podían determinar el género masculino al nacer en los niños. Mientras que en oriente, desde el siglo III, los chinos ya dibujaban y describían las orquídeas científicamente (Coronado y Soto, 2004).

En el México Prehispánico, durante el periodo 1427 – 1440, los aztecas se encontraban conquistando, entre muchas otras zonas, el imperio totonaca, recibiendo de ellos el fruto de la orquídea vainilla como tributo, para utilizarla como aromatizante del chocolate, una bebida preparada para la nobleza azteca. En náhuatl se conocía como “tlil-xochitl” (flor negra), recolectándose en la región de bosque tropical de los estados de Veracruz, Puebla y Oaxaca durante el periodo Prehispánico y Colonial (InfoAserca, 2002; Lugo, 2012).

Desembarca en 1492 Cristóbal Colón en la Isla Guanahaní, que ahora se cree es San Salvador, en la que observó “hojas de cinco o seis clases y todas diferentes” que eran orquídeas. En 1552 se publica el “*Libellus de medicinalibus indorum herbis*” mejor conocido como Códice de la Cruz-Badiano, un tratado de plantas medicinales aztecas en el que se hace referencia por primera vez a las orquídeas americanas. En 1570 Francisco Hernández de Toledo es enviado por Felipe II al Nuevo Mundo a catalogar las riquezas naturales de los nuevos imperios en la primera expedición científica; entre la cantidad increíble de plantas que describió se encontraban *Stanhopea tigrina* y *Laelia majalis*. Los alemanes Hieronymus Tragus o Hieronymus Bock en 1539 en su obra “Kreüter Buch”, y el jesuita Athanasius Kircher en su libro “Mundus subterraneus” en 1665, afirmaban que las orquídeas no producían semillas y que en vez de ello brotaban del semen perdido del apareamiento de los mamíferos, ahora sabemos que probablemente su confusión fue generada por la pequeñez de las semillas de estas plantas, sin embargo, este pensamiento llevó a considerarlas como un impulso hacia los excesos (Hirtz, 2004).

Durante el siguiente siglo hubo una serie de descubrimientos y descripciones científicas sobre la flora de muchas regiones en el mundo y entre algunas de ellas iban incluidas las orquídeas. Johann Bauhin en sus obras de 1619-1650 distinguió 40 especies de orquídeas de las que aún se utilizan algunos de sus nombres (*Orchis militaris*, *Himantoglossum hircinum*). Hendrik van Rheedee, aunque fue militar también fue naturalista y en su libro “*Hortus Malabaricus*” en 1675 reconoce las primeras orquídeas en la región de Malabar al suroeste de la India. El alemán Rudolf Jakob Camerarius en 1694 menciona en “*De sexu plantarum epistola*” diferencias entre las partes masculinas y femeninas de estas flores y describe su reproducción. Joseph

Pitton de Tournefort, quien aclaró el concepto de género en las plantas, describió en 1700 la familia de las orquídeas occidentales en seis géneros: *Orquis*, *Helleborine*, *Calceolus*, *Limodorum*, *Ophrys*, *Nidus-Avis*. En 1731 Mr. Collison regresa de la Isla de la Providencia, en el mar Caribe, a Inglaterra con 15 especies de orquídeas, siendo una *Bletia verecunda* la primera en florecer en Europa, despertando con ello el interés comercial. En 1753 Carl Nilsson Linnaeus clasificó a las orquídeas tropicales en *Epidendrum* y describió alrededor de veinte especies en su obra "*Species Plantarum*". Christian Konrad Sprengel en 1793 describe la estructura de las orquídeas europeas y menciona el papel de los insectos en la reproducción sexual de estas plantas, fue este eminente botánico quien llamó la atención de Darwin en el tema.

Fue en el siglo XIX cuando las orquídeas comenzaron a ser populares en Europa. Willian Cattley obtuvo de Brasil una planta que en pocos meses dio una flor lavanda moteada de púrpura, la cual en 1821 el botánico Lindley describiría como *Cattleya labiata*, luego de clasificar cerca de dos mil especies de orquídeas exóticas en "Genera and Species of Orchidaceous", para mediados del siglo la orquídea *Cattleya* ya era muy popular entre los aficionados europeos siendo un símbolo de status social el poseer sus costosas flores. Entre 1836-1847 el alemán Karl Theodor Hartweg realizó expediciones al Nuevo Mundo para la Sociedad de Horticultura de Londres, los ejemplares que consiguió llegaron al Jardín Botánico Real de Kew para John Lindley (Castle, 1886; Hirtz, 2004; Shapiro, 2011).

En 1862 Darwin publicó el libro "Sobre las variadas estrategias por las cuales las orquídeas británicas y foráneas son fertilizadas por insectos, y sobre los buenos efectos de la polinización cruzada", que en castellano recibió el nombre de "La

fecundación de las orquídeas”, para el cual estudió cerca de 150 especies logrando describir con profundo detalle la diversidad de estrategias para la polinización cruzada, además complementó y reafirmó sus observaciones con especies de otras partes del mundo, gracias al intercambio epistolar con otros expertos, como Fritz Müller quien le aportaba especies del sur de Brasil, y Joseph Dalton Hooker del Jardín Botánico de Kew. Estudió y describió el mecanismo de fecundación con profundo detalle (Cadevall, 2009; Moreira, 2010).

Para el siglo XX el interés en las orquídeas es mayoritariamente ornamental en todo el mundo, salvo algunas regiones donde siguen siendo empleadas con fines medicinales o gastronómicos. Ambos géneros de estudio son considerados “estándar” por los cultivadores para comparar cualidades de otras orquídeas, *Phalaenopsis* conocida comúnmente como la “orquídea mariposa” y *Cattleya* como la “reina de las orquídeas”.

A lo largo de esta historia se puede notar como las orquídeas han sido apreciadas en muchas culturas por diferentes razones, pero son su belleza y variedad de formas las cualidades que más demanda el hombre de estas plantas, así como lo que da inicio a su comercialización.

2.1.2 Distribución Geográfica y Hábitat

Las orquídeas se pueden encontrar por casi todo el mundo con excepción de los Polos norte y sur, son consideradas cosmopolitas, aunque en las regiones tropicales o cálido húmedas suelen ser más abundantes. Así como varía su distribución varía su hábitat. En regiones frías y templadas hay abundancia de orquídeas terrestres, en las regiones alpinas y de precipitaciones nivales, como en

los lagos patagónicos, desarrollan raíces tuberosas con grandes reservas para sobrevivir el tiempo invernal bajo tierra, mas en primavera y verano producen una parte aérea que desarrolla hojas y flores; en cambio en regiones templadas durante el verano sobreviven bajo tierra debido a la alta temperatura y llegando el otoño comienzan su desarrollo foliar para florecer durante la primavera. Por otro lado, las epífitas se encuentran dispersas por regiones tropicales donde permanece una alta humedad y precipitaciones abundantes por lo que la estación seca no provoca la pérdida de las partes aéreas pudiendo florecer durante todo el año (Ver Figura 2.1).

Se considera que el límite de distribución de orquídeas epífitas desde el Ecuador se encuentra a los 35° de latitud, en latitudes superiores (hasta los 68° latitud norte y 56° latitud sur) el cambio climático determina la dominancia de las orquídeas terrestres. Se pueden encontrar orquídeas desde los 0 hasta los 4 000 msnm (Barba *et al.*, 2002; Freuler, 2003).

Los únicos lugares donde no se desarrollan son los glaciares, desierto hiperárido y en aguas abiertas. La mayor diversidad de la familia de orquídeas se encuentra en las zonas tropicales en Asia, África y América (Campbell, 2013).

Géneros particulares están restringidos a una distribución geográfica, por ejemplo : *Dendrobium*, *Phalaenopsis*, *Vanda* y *Paphiopedium* se encuentran en los trópicos de Asia y Australia, mientras que *Pleurothallis*, *Epidendrum*, *Cattleya* y *Oncidium* se encuentran en los trópicos de América. Esto se atribuye a la poca reserva de nutrientes que contienen las semillas, por lo que los embriones morirían en poco tiempo, además que su cubierta de apenas una célula de grosor no los protegería de la desecación o de la exposición a la luz ultravioleta; sin embargo, aunque la dispersión a larga distancia de las semillas no es común, a pesar de su

tamaño tan diminuto, para poder explicar su distribución geográfica actual se considera que este suceso ocurrió en al menos tres ocasiones durante la evolución de la familia.

Los dos géneros de estudio, *Cattleya* y *Phalaenopsis* son orquídeas epífitas y se desarrollan en climas tropicales y templados. La orquídea mariposa es originaria del sudeste de Asia, desde las montañas del Himalaya hasta las Filipinas, Indonesia y Norte de Australia, es abundante en ambientes templados pero también se desarrolla a nivel del mar y en grandes altitudes. Mientras que el género *Cattleya* se encuentra distribuido desde el sur de México hasta zonas tropicales de Sudamérica (Hiche *et al.*, 2004; Espinosa *et al.*, 2009; Shapiro, 2011).

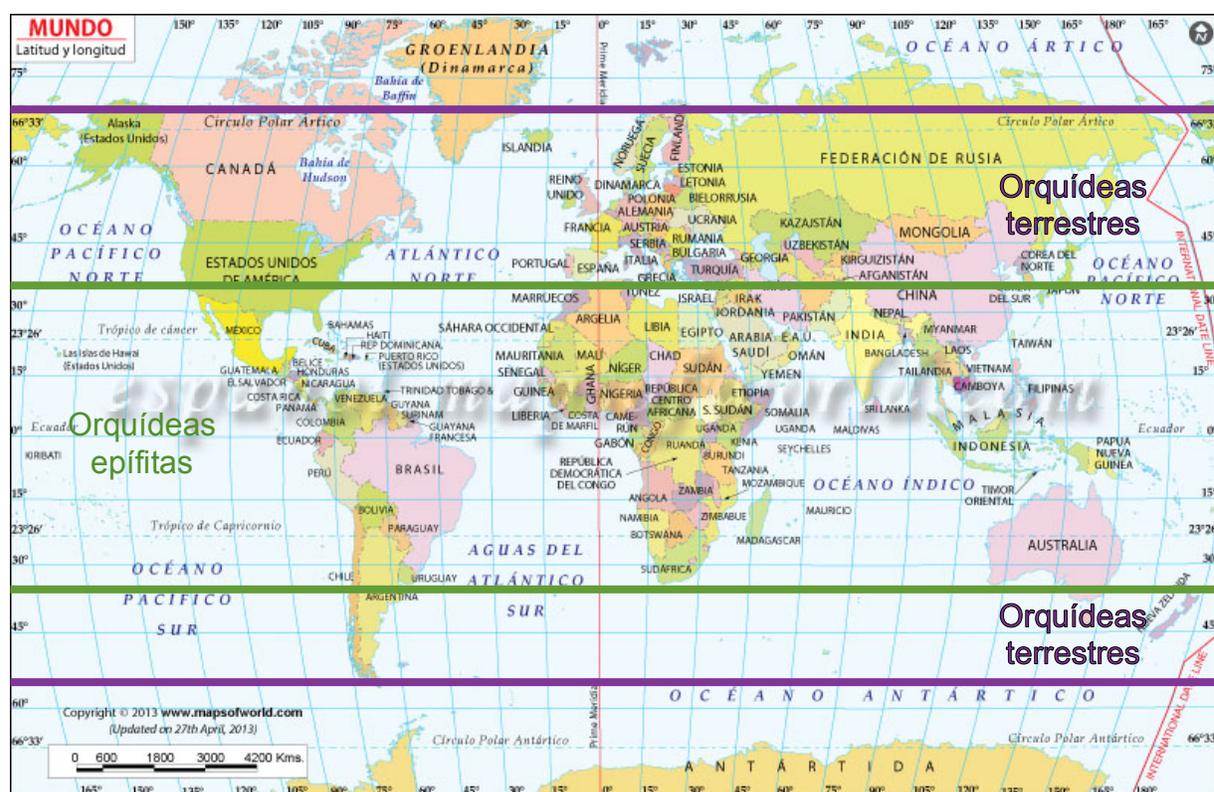


Fig. 2.1. Mapa de distribución general de orquídeas epífitas y terrestres de acuerdo a la latitud (Tomado y modificado de espanol.mapsofworld.com)

2.1.3 Clasificación Taxonómica y Evolución

De acuerdo a las bases de datos internacionales reconocidas los géneros de estudio se clasifican taxonómicamente como sigue (Stevens, 2001 Angiosperm Phylogeny Website; EOL, 2014; ITIS, 2014; GBIF, 2014):

Reino: **Plantae**, que se refiere al reino vegetal (descrito por Haeckel en 1866).

Sub-reino: Viridiplantae, que abarca las plantas verdes (descrito por Cavalier en 1981).

Infra-reino: Streptophyta, donde se encuentran las plantas terrestres y algas carofitas (descrito por Jeffrey en 1967).

Super-división: Embryophyta, que se refiere a las plantas terrestres (descrito por Engler en 1892).

División: **Tracheophyta**, que se refiere a las plantas vasculares (descrito por Sinnot en 1935).

Sub-división: Spermatophytina, en la que se engloban a las espermatofitas, plantas del antiguo taxón de las fanerógamas, y que comprende a todas las plantas que producen semilla (descrito por Willkomm en 1854).

Infra-división: Magnoliophyta (descrito por Linneo en 1735), también conocida como Angiospermae (descrito por Cronquist en 1966), que se refiere a las plantas con flores y frutos, y que se divide en dos grupos: monocotiledóneas y dicotiledóneas.

Los estudios recientes de análisis moleculares han generado nuevos sistemas de clasificación como el APG (del inglés Angiosperm Phylogeny Group, o sea, grupo para la filogenia de las angiospermas) III del 2009 reemplazando la APG II de 1998 y el APWeb (del inglés Angiosperm Phylogeny Website). Estos nuevos sistemas se

basan en un análisis cladístico el cual busca agrupar los organismos por sus relaciones evolutivas. De acuerdo a esta clasificación existe el grupo Mesangiospermae aún sin rango taxonómico pero que se encuentra entre la infradivisión magnoliophyta y la clase liliopsida agrupando a todas las angiospermas que no se encuentren dentro del grado ANITA (descrito por Donoghue en 2007).

____Clase: **Liliopsida** (descrito por Batsch en 1802), también conocida como **Monocotyledoneae** (descrito por Scopoli en 1760), que se refiere al grupo de las monocotiledóneas.

Aunque el grupo Lilianaes (descrito por Zabinkova en 1966), que se refiere al grupo de liliáceas, no está estandarizado conforme el Código Internacional de Nomenclatura el ITIS lo presenta como Superorden aprobado mientras que el Angiosperm Phylogeny Website lo presenta como clase y refiriendo a Takhtajan como autor, por otro lado la EOL presenta el grupo Petrosaviidae (descrito por Graham y Judd en 2007) que abarca a las petrosaviaceae incluyendo además taccales, pandanales, liliales, iridales y commelinidaes. Sin embargo el antiguo orden Liliales hubo de ser dividido con respecto a los nuevos datos de análisis moleculares.

____Orden: **Asparagales** (descrito por Link en 1829), que actualmente se utiliza por el APG III y el APWeb, abarca 14 familias aunque los límites entre algunas de ellas aún son poco claros. Dadas las diferencias en diversidad y morfología se ha propuesto que Orchidaceae sea colocada en su propio orden.

____Familia: **Orchidaceae** (descrito por A. L. de Jussieu en 1789), la más grande de las angiospermas, cuenta con una morfología floral muy distintiva. Su diversidad se encuentra alrededor de los 800 géneros y 27 800 especies aceptadas, que representan más de un tercio de las especies de monocotiledóneas. Los

estudios morfológicos y moleculares han permitido dividir la familia en cinco sub-familias.

Sub-familias: **Apostasioideae** es considerado el grupo más primitivo que surgió hace 92 a 74 m.a. abarca solo dos géneros y 15 especies, **Vanilloideae** que se estima surgió hace 87 a 64 m.a. incluye 14 géneros y 245 especies, **Cypripedioideae** calculado hace 73 a 54 m.a. contiene cinco géneros y 170 especies, **Orchidoideae** que surgió entre los 64 a 42 m.a. cuenta con 208 géneros y 3 755 especies, y **Epidendroideae**, la más abundante con tres quintas partes de las especies de orquídeas surgió hace 60 a 29 m.a. y cuenta con 650 géneros y 21 600 especies; a esta última pertenecen los géneros de interés (Ver Figura 2.2).

Gracias al estudio de la filogenia de la familia se ha podido hacer el análisis evolutivo de varios caracteres adaptativos como la polinización especializada, la duplicación del genoma, el hábito epifítico, el metabolismo CAM (del inglés Crassulacean Acid Metabolism) y la reducción del número de estambres funcionales, adaptaciones morfológicas y fisiológicas que determinan hasta el día de hoy la riqueza de especies y la gran distribución geográfica que han logrado.

Los estudios botánicos sugieren que la diversidad de grupos de orquídeas se formó después de la separación de Pangea, Laurasia, y Gondwana; otras hipótesis para explicar la diversidad en Orchidaceae son la especialización de los polinizadores, y la fragmentación del hábitat (Stevens, 2001; Donoghue *et al.*, 2007; Cameron, 2011; Menchaca, 2011; Campbell, 2013).

La subfamilia Epidendroideae se divide a su vez en 14 tribus, las que competen al estudio son las siguientes:

Tribu: Vandeeae

____ Género: ***Phalaenopsis*** sp. Blume, 1825 con aproximadamente 60 especies.

Tribu: Epidendreae

____ Género: ***Cattleya*** sp. Lindley, 1824 que incluye entre 50 y 75 especies.

Ambos géneros cuentan con un gran número de híbridos entre especies así como con otros géneros (Shapiro, 2011).

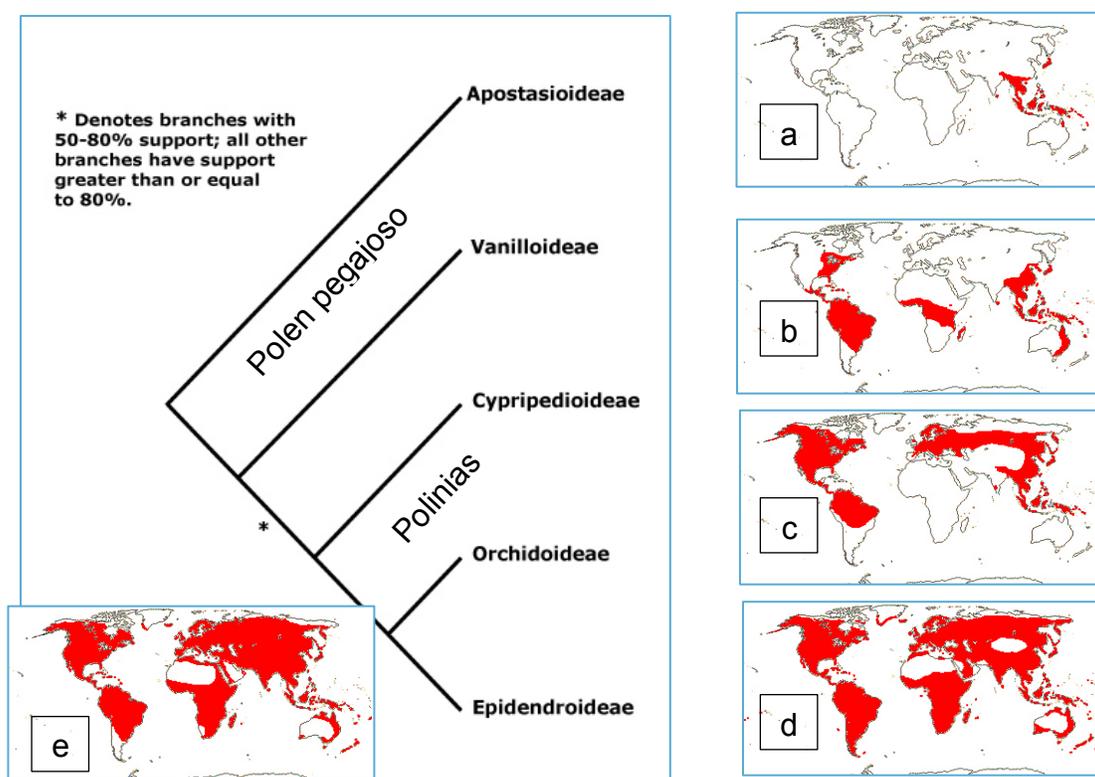


Fig. 2.2. Árbol filogenético de las sub-familias Orchidaceae a la izquierda. A la derecha mapas de distribución de las sub-familias, a) Apostasioideae, b) Vanilloideae, c) Cypripedioideae, d) Orchidoideae, e) Epidendroideae. Tomado y modificado de Stevens, 2001.

2.1.4 Descripción Botánica

Las orquídeas presentan una gran variabilidad morfológica por lo que es conveniente hacer una descripción botánica de la familia, puntualizando algunas

diferencias importantes entre las sub-familias, haciendo hincapié en las características de los géneros de estudio.

Los miembros de la familia Orchidaceae son plantas herbáceas y perennes que se reconocen con facilidad gracias a la morfología de sus flores que tienen un solo plano de simetría (monosimétricas), cuentan con uno a tres estambres unidos al estilo al menos en la parte basal; generalmente las flores realizan un giro o torsión del ovario y pedicelo (resupinación), por lo que quedan dirigidas hacia abajo y el complejo labelo queda más alejado del eje. Su ovario es inferior y su fruto o cápsula se abre por un costado liberando diminutas pero numerosas semillas. Por lo general se desarrollan en lugares donde escasea el agua y los nutrientes por lo que han desarrollado adaptaciones para sobrevivir como órganos almacenadores de agua, raíces capaces de realizar la fotosíntesis y flores con estrategias para su reproducción.

2.1.4.1 Tipo de crecimiento

Las orquídeas se pueden identificar por el tipo de crecimiento como simpodiales, monopodiales o semiepífitas, un ejemplo se muestra en la Figura 2.3.



Fig. 2.3. Izquierda: Crecimiento simpodial en *Oncidium* spp. (Tomado de Bateman, 1895). Centro: Crecimiento monopodial en *Phalaenopsis* spp. (Tomado de Espinosa et al., 2009). Derecha: Crecimiento trepador en *Vanilla* spp. (Tomado de <https://norfipc.com/fotos/cuba/campechal/planta-orquidea-vanilla.jpeg>).

Simpodial. Se caracterizan por tener un crecimiento aparentemente horizontal con tallos rastreros llamados rizomas, los cuales presentan varios meristemas de los que brotan retoños individuales de crecimiento finito que se desarrollan en otro tipo de tallos y hojas, y que al madurar producen flores, logrando así incrementar la supervivencia de la planta. Estos tallos se convierten en órganos de almacenamiento llamados pseudobulbos, cada uno de los cuales puede tener como máximo dos meristemas ubicados en cada extremo opuesto de la base. Las hojas crecen a partir del pseudobulbo y suelen ser más delgadas ya que la función de reserva la cumple el pseudobulbo, las raíces se originan en el pseudobulbo y en el rizoma, y las flores pueden originarse de yemas en los extremos del pseudobulbo, en la base de las hojas o en la base de la planta. Ejemplos de orquídeas con este crecimiento son: *Cattleya*, *Dendromium*, *Cymbidium*, *Miltonia*, *Oncidium*, *Lycaste* y *Paphiopedillum*.

Monopodial. Las orquídeas con crecimiento monopodial presentan un tallo central vertical, del que crece continuamente el extremo produciendo hojas alternas e inflorescencias entre las hojas. Carecen de rizoma y de pseudobulbos. Puesto que solo cuentan con un ápice meristemático terminal si éste se destruye la planta se pierde. Las hojas nuevas surgen del extremo apical y suelen ser más gruesas puesto que cumplen funciones de fotosíntesis y de reserva, las raíces se originan sobre el tallo pero debajo de las hojas, y las flores se originan de yemas axilares Algunos géneros con este crecimiento son: *Phalaenopsis*, *Vanda* y *Aerides* (Murguía, 2007).

Semiepífito. Existen pocas orquídeas que utilizan los árboles u otras estructuras como guía para su crecimiento, pero la más representativa es la vainilla. Aunque su hábito de crecimiento es semiterrestre, trepador y carece de pseudobulbos se considera una planta monopodial con ramificaciones. Sus raíces

terrestres son carnosas y tuberosas mientras que sus raíces aéreas son fotosintetizadoras tal como una epífita (Freuler, 2003).

2.1.4.2 Partes de la planta

Flor. Pueden presentarse varias o una sola flor, y puede ser, terminal si surge de la punta del tallo o pseudobulbo, basal si la vara floral surge de la base del pseudobulbo, o axilar si la vara floral sale de entre el tallo y la hoja. El tamaño es muy variable desde unos pocos milímetros hasta 45cm de diámetro, pero generalmente son bisexuales, algunas son resupinadas (con un giro de 180° durante el desarrollo).

Una de las características que distingue a las orquídeas de todas las demás flores es la forma zigomorfa (simetría bilateral) de la flor, como puede observarse en la Figura 2.4. Poseen tres sépalos casi idénticos entre sí, que ubicados en la parte de atrás, forman la funda del capullo protegiendo la flor, cuando ésta abre, el ápice puede producir néctar sirviendo así como órganos de atracción.

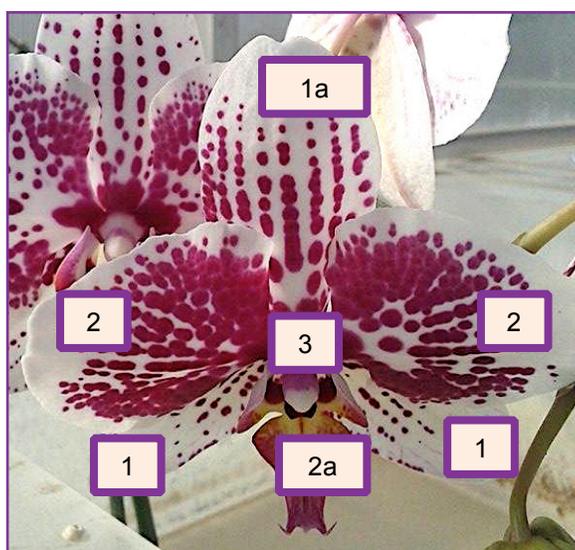


Fig. 2.4. Partes principales de la flor. 1a) sépalo dorsal; 1) sépalos laterales; 2a) labelo; 2) pétalos; 3) columna.

Presentan tres pétalos internos en la parte de enfrente, de los cuales dos son iguales y laterales y uno diferente central, la coloración es increíblemente variada pudiendo ser moteados o de un solo color; el pétalo del centro denominado labelo, es la parte que presenta mayores adaptaciones y su función es atraer a los polinizadores, por ello a menudo presenta protuberancias o crestas y una inusual forma o patrón de color, además puede producir néctar, aceites o compuestos aromáticos, provee además una ayuda visual o táctil para orientar al polinizador, y es un factor muy importante a tomar en cuenta en la creación de nuevos híbridos (Darwin, 2008).

Existen pocas excepciones de flores unisexuales, como *Catasetum* y *Cycnoches*, en realidad la mayoría de las orquídeas son hermafroditas, y sus órganos sexuales femenino y masculino se encuentran dentro de una pieza central llamada columna, y que contiene los estambres que se presentan en grupos de tres o menos, unidos al estilo y estigma. La antera se encuentra ubicada en la punta de la columna y suele tener forma de casco, se encarga de proteger al polen que generalmente se encuentra agrupado en masas suaves o duras llamados polinios, que se agrupan en paquetes de dos, cuatro u ocho. Debajo de la antera o casquete se encuentra el estigma que es donde se coloca el polen para la formación de frutos. El estilo y el estigma se encuentran separados por una porción puntiaguda llamada rostelo, que sirve como barrera para evitar que la planta se auto polinice, una parte de éste puede formar una almohadilla pegajosa junto a los polinios llamada viscidio, que adhiere el polen a los insectos para que pueda ser transportado para polinizar otras flores. Pocos casos presentan caudículas, que toman el lugar del viscidio, y solo especies muy primitivas no presentan polinios.

Presentan 3 carpelos, el ovario inferior generalmente con placentación parietal, aunque en ocasiones es axilar. Presentan numerosos óvulos con una delgada pared del megasporangio.

Los polinios aseguran la fertilización de numerosos óvulos resultando semillas diminutas que carecen de endospermo y de un embrión diferenciado, por lo que la micoheterotrofia obligada compensa estas deficiencias (Stevens, 2001).

Polinización. Con el tiempo las orquídeas han co-evolucionado con sus polinizadores desarrollando estrategias muy diversas para lograr la polinización cruzada, un claro ejemplo lo encontramos en *Cypripedium pubescens* cuyo polinizador, una abeja, entra por una abertura superior pero para poder salir debe resbalar por un pequeño orificio inferior en el cual debe friccionar el estigma donde deposita el polen para la fecundación de la flor, y en seguida friccionar una de las anteras de esa flor, de tal manera que incrementa la probabilidad de fecundación cruzada entre plantas distintas. El néctar dulce de *Epipactis* solo atrae a avispas por lo que si éstas se extinguieran en alguna región probablemente también *E. latifolia* desaparecería. Darwin (2008) predijo gracias a la coevolución observada que existía una mariposa con una probóscide de 25-28 cm ya que el nectario de *Angraecum sesquipedale* mide 30cm y sólo contiene 4cm llenos de néctar, y fue gracias a Fritz Müller que se confirmó la especulación al enviarle a Darwin una esfinge (lepidóptero) encontrada en Brasil con una probóscide de entre 25 y 28cm.

Las flores de las orquídeas son extremadamente variadas en su forma y en como atraen a sus polinizadores que pueden ser desde insectos hasta incluso aves. Algunas atraen visitantes generales pero otras presentan una gran especialización atrayendo solo uno o dos polinizadores. El caso de *Catasetum* es especial pues la

flor masculina lleva a cabo un lanzamiento literal de los polinios en el momento justo en que el polinizador toca ciertos puntos de la flor de manera que se queden pegados al insecto que al visitar una planta hembra introducirá el extremo de la flecha que sostiene el polen en la cavidad estigmática. *En Orchus pyramidalis* el polinio cambia de forma luego de ser extraído por el polinizador asumiendo una posición tal que le permita tocar la superficie estigmática de otra flor (Darwin, 2008, Cadevall, 2009).

El polen, néctar o fragancias florales pueden ser empleadas como recompensas a sus polinizadores, algunas mimetizan la forma de insectos hembra y son polinizadas cuando el macho intenta aparearse con la flor, evento conocido como pseudocopulación.

En algunas especies la polinización es un evento muy raro, por lo que las flores permanecen funcionales y abiertas por varios días, con marchitez del periantio ocurriendo rápidamente después de la fertilización. Tal es el caso de *O. apifera*, que hubo de sufrir ligeras modificaciones con el fin de fecundarse a si misma, Darwin (2008) infiere que a partir de sus estructura floral es casi seguro que anteriormente estaba adaptada a la fecundación cruzada, pero al no conseguir producir suficientes semillas debió cambiar a la autofecundación.

Fruto y semillas. Posterior a la polinización, los granos de polen germinan sobre la superficie estigmática generando tubos polínicos que se extienden hacia el ovario, y la fertilización del óvulo viene al cabo de días, semanas o meses. Si ésta no ocurre, la cápsula o fruto detiene su desarrollo y muere. La cápsula presenta de tres a seis hendiduras longitudinales, si la fertilización es exitosa, se desarrollan en su interior miles de pequeños embriones que poseen entre 8 a 200 células, cada uno

rodeado de una cubierta o testa formada por lo general por apenas una capa de células muertas, y careciendo de endospermo, por lo que requieren de fuentes de nutrición externas hasta que se desarrollen lo suficiente para fabricar sus propios alimentos. En condiciones naturales dicha fuente la provee la asociación con un hongo (micorriza) el cual induce la germinación y que puede presentar cierta especificidad con un limitado rango de plantas emparentadas.

Las semillas pueden ser filiformes, cilíndricas con punta o asemejar alas, su tamaño varía desde unas pocas micras hasta unos 5 mm, su peso se encuentra entre 1 a 22 μg , son tan pequeñas y ligeras que se dispersan con ayuda del viento (Ver Figura 2.5). Darwin (2008) atribuye la abundancia de semillas a una lucha por la existencia, un intento por evitar la extinción demostrando a la vez pobreza de recursos o bien, necesidad de protección contra otros peligros, una de las bases de la selección natural.



Fig. 2.5 Izquierda: cápsulas abiertas con semillas expuestas de *Phalaenopsis* a la izquierda y *Cattleya* a la derecha (Tomado de www.orquideoteca.blogspot.com).

Tallo. Existen tres tipos principales: tallos cilíndricos, alargados y erectos, como carrizos con entrenudos de donde surgen las hojas e inflorescencias; pseudobulbos, gruesos, aéreos, comprimidos y abultados, pueden alcanzar un gran tamaño y ser de varias formas, sus hojas salen de la parte alta o media y la inflorescencia de cualquier parte de él; y cormos o tallos subterráneos gruesos, casi

esféricos con varios entrenudos, almacena agua y reservas en forma de almidón permitiendo rebrotar a la planta en caso de perder su parte aérea.

Hojas. Son usualmente alternas, y a menudo crecen plegadas en la base o a lo largo del tallo, la venación es paralela generalmente, y carecen de estípulas. Siempre son hojas simples con márgenes enteros, sin aserraduras o espinas, por lo general son alargadas y angostas. Pueden ser gruesas y correosas o delgadas y suaves.

Raíces. Son aéreas y están cubiertas por una funda de células muertas y esponjosas llamada velamen. Poseen clorofila por lo que pueden realizar fotosíntesis. El velamen facilita la absorción de agua y minerales. Pueden crecer en todas direcciones y sirven para que la planta se sujete de algún soporte como troncos, ramas, rocas, entre otros. Generalmente tienen una fuerte relación de micorriza con hongos que ayudan a la absorción de nutrientes (Sheehan, 2004; Murguía, 2007; Judd *et al.*, 2008; Cameron, 2011; Menchaca, 2011).

La subfamilia Apostasioideae es fundamentada por sus elementos de vasija con placas con perforaciones simples y semillas distintivas. Cyripedioideae se caracteriza por su labelo en forma de saco resbaladizo y media antera modificada dentro de un escudo. Vanilloideae se distingue por sus flores que tienen solo un estambre funcional y carece de polinio. Epidendroideae comparte la apomorfia de una antera principal y picuda. Mientras que Orchidoideae comparte la apomorfia de una antera con ápice agudo, estambres suaves, hojas complejas pero no plegadas y ausencia de estructuras de sílice (Judd *et al.*, 2008).

Darwin creía que todas las partes de la flor son modificaciones de 15 órganos ancestrales: “¿No es una idea más sencilla y comprensible que todas las Orquideae

deben lo que tienen en común al hecho de descender de una planta monocotiledónea que, como muchas otras de la misma clase, poseía 15 órganos ordenados alternativamente tres dentro de tres en cinco verticilos, y que la actual estructura maravillosamente modificada de la flor se debe a una larga trayectoria de paulatina modificación, en la que se ha preservado cada modificación que resultó útil para la planta, durante los incesantes cambios a los que quedó expuesto el mundo orgánico e inorgánico?” (Cadevall, 2009)

La sub-familia Apostasioideae posee el labelo menos diferenciado con tépalos apiculados, sus dos o tres estambres están unidos al estilo sólo en la base a comparación de las otras sub-familias que están casi o completamente fusionados formando un gimnostemo que es considerado una extensión del eje floral y que se conoce comúnmente como columna. Sus hojas están en forma de espiral alrededor del tallo. Algunos estudios proponen que se diferencie Apostasioideae como otra familia dada la dificultad para definir si posee o no columna. Sus semillas son oscuras y poseen una capa celular interna y otra externa en la testa. Su saco embrionario es bispórico y su número cromosómico es $n=24$

Vanilloideae es de crecimiento monopodial, aunque carece de polinias el polen esta algo organizado y llega a formar tetradas, carece de viscidio pero ya posee rostelo, su antera se dobla hacia delante por la expansión de la columna. Sus semillas son generalmente alargadas. Su número cromosómico es $n=9, 10, 12, 14, 16, 18$.

Cypripedioideae posee géneros epífitos, sus raíces presentan vellosidades a manera de velamen, se caracteriza por poseer dos estambres y un labelo en forma de saco (sacciforme) profundo motivo por el cual son conocidas como “zapatillas de

dama". Su polen también se organiza en tétradas además de presentar surcos y en algunos géneros es pegajoso. Su número cromosómico es $n=9$ o más.

Orchidoideae presenta rizomas y velamen diferenciado, se caracteriza por poseer hojas suaves y anteras erectas, los polinios ya se encuentran bien definidos presentando un tallo o caudícula que se extiende desde la base del polinio y un tallo o hamulus (también se refiere como retináculo) que enseguida de la caudícula se une a la parte apical del rostelo. Su número cromosómico es $n=12-24$.

Epidendroideae comúnmente son epífitas, posee hojas y tallos carnosos, posee polinios duros de superficie cerosa. Su número cromosómico es $n=5$ o más (Stevens, 2001; Menchaca, 2011).

2.1.4.3 Descripción botánica de *Phalaenopsis*

El hábito de desarrollo de la orquídea mariposa es monopodial, son de hábito epífito y no posee pseudobulbos, sus raíces son gruesas y están recubiertas por velamen, su tallo es erecto. Cada año produce en el extremo dos gruesas y carnosas hojas alternas y elípticas (Ver Figura 2.6). Las hojas basales que son más viejas se caen al mismo tiempo. Cuando Carl Ludwig Blume la describió en 1825 no diferenció pétalos de sépalos como tales, sino que los llamó sépalos interiores.

Su floración ocurre de dos a tres veces por año dependiendo de su cultivo, y puede durar de seis a diez semanas. Las inflorescencias suelen ser ramificadas. La flor se mantiene en buenas condiciones además de presentar un gran número de flores por vara y son fácilmente reconocibles por la uniformidad del color y forma de los sépalos y pétalos. El labelo trilobulado generalmente presenta dos apéndices en el ápice (Hiche *et al.*, 2004; Espinosa *et al.*, 2009).

2.1.4.4 Descripción botánica de *Cattleya*

Esta orquídea es de hábito epífita y presenta pseudobulbos, sus hojas son alargadas y delgadas y salen del ápice del pseudobulbo (Ver Figura 2.6). Sus flores, que produce dos veces al año, son grandes con pétalos anchos y puede generar hasta tres flores que pueden durar de una a cuatro semanas en el caso de las labiadas o unifoliadas, y son pequeñas y más coloridas en el caso de las bifoliadas las que se presentan en racimos (Schooser, 1993).



Fig. 2.6. Ilustraciones de *Phalaenopsis amabilis* a la izquierda y *Cattleya labiata* a la derecha.

2.1.5 Usos e Importancia Económica

Como se describió al inicio, la humanidad ha aprovechado diferentes propiedades de estas plantas. Entre los usos internacionales se encuentran los tradicionales ramos de novia, ya que su elegancia da un toque único a los arreglos florales, además son comúnmente asociadas a la juventud, fertilidad y regocijo en muchas culturas (Inteligencia Comercial e Inversiones, 2013).

En México aún se sigue cultivando vainilla para extraer un extracto vegetal que se utiliza para añadir sabor y aroma a diversos alimentos y bebidas, también se

utiliza en productos de farmacia, cosméticos, tabaco y artesanías. En 2008, su volumen de producción alcanzó 522.88 toneladas de vainilla, en la actualidad es el segundo condimento más caro. También en México, se aprovecha el mucílago contenido en los pseudobulbos de algunas especies que es utilizado para elaboración de dulces (*Laelia autumnalis*), en el arte plumario (*Encyclia venosa*), los géneros *Prosthechea* y *Bletia* para elaborar adhesivos, mordentes de pigmentos e instrumentos musicales; otros géneros se usan con fines medicinales como *Arpophyllum spicatum* contra la disentería, *Encyclia citrina* para curar heridas, así como *Catasetum integerrimum*, *Cyrtopodium punctatum*, *Myrmecophila christinae*, *Rhyncholaelia digbyana*, *Epidendrum anisatum*, *Laelia autumnalis* y *Bletia campanulata*. Otras especies se utilizan aún como elementos rituales, por ejemplo: *Laelia autumnalis* es una orquídea endémica de México ampliamente usada en la celebración del Día de Muertos en el estado de Michoacán (Comité Estatal Sistema Producto Vainilla de Puebla, A.C., 2010; Cox, 2013, SINAREFI, 2015).

En China se comercializan orquídeas como *Dendrobium*, *Gastrodia elata*, *Bletilla striata*, *Anoectochilus formosanus*, *Cremastra appendiculata* que son utilizadas en la medicina tradicional para tratar diferentes afecciones a la salud como fiebre, diabetes, gastritis, cáncer, cataratas, entre otras (Bulpitt *et al.*, 2007).

Sin embargo, el principal uso de las orquídeas es como plantas de ornato. Cuando comenzaron a ser trasladadas desde otras partes del mundo hacia Europa en el siglo XVIII, surgió el interés comercial. Y lo que en un inicio fue una especialidad para los botánicos, se convirtió en una “orquideomanía”, ya que los nobles debían construir un orquideario de acuerdo a su estatus, y cuando uno de sus

ejemplares florecía se organizaban grandes fiestas, tales que la noticia aparecía en las primeras planas de la prensa (Hirtz, 2004).

El mercado de plantas de orquídeas comienza en 1821, cuando Conrad Loddiges e hijos cultivan orquídeas comercialmente en su invernadero cerca de Londres, surtiendo de plantas a los nobles provincianos que podían pagar la construcción de los invernaderos necesarios para poder cultivarlas. Mientras que la producción de orquídeas para venta de flor cortada toma importancia hasta 1913 cuando Sun Kee inaugura su invernadero en Singapur, produciendo orquídeas tipo racimo (espádice), que para 1988 ya contaba con 13.3 hectáreas dedicadas al cultivo de *Arachnis*, *Aranda* y *Aranthera* (Sheehan, 2004).

Las orquídeas son parte del grupo de flores con alta demanda a nivel global. En los Cuadros 2.1 y 2.2 se puede observar que en el 2013 se registraron los mejores valores de comercialización de orquídeas a nivel mundial dentro del periodo 2010-2013. En ese año se reportó el comercio internacional de híbridos y especies de orquídeas transportadas como: plantas vivas, flor cortada, extractos, raíces y plantas secas.

Cuadro 2.1. Importación registrada de Orquidaceae hybrid en 2013 †.

Importador	Cantidad	Exportador
Francia	33 822	Tailandia, Taiwán
Chile	5 407	Bélgica
Alemania	1 985	Tailandia, Taiwan, Colombia, Ecuador
Suecia	460	Tailandia
República Checa	205	Tailandia
Polonia	35	Tailandia

†Fuente: Base de datos sobre el comercio CITES.

El mayor importador de plantas híbridas fue Francia, siendo Tailandia el país que exporta a la mayoría de los países importadores. Mientras que en especies, el país que más importaciones registró fue Alemania, sobresaliendo Tailandia nuevamente como el mayor exportador. México solo tuvo una pequeña participación como exportador en ese año (CITES).

Cuadro 2.2. Importación registrada de Orchidaceae spp. en 2013 †.

Importador	Cantidad	Exportador
Alemania	3 675	Tailandia, Taiwán, Ecuador, Perú, EUA, México, Colombia, Madagascar, Brasil
Italia	1 365	Tailandia, Brasil, Malasia
Países Bajos	240	Tailandia
Nueva Zelandia	100	República Árabe Siria
Bélgica	50	Perú
Francia	46	Tailandia, Ecuador

†Fuente: Base de datos sobre el comercio CITES.

2.1.5.1 Mercado del género *Phalaenopsis*

Este género de orquídea es muy apreciada por su belleza. Se cultiva en macetas y puede utilizarse tal cual en adornos florales, aunque también se comercializa como flor cortada. Hasta el 2008 seguía siendo la planta más importante de las subastas holandesas (Espinosa *et al.*, 2009).

En el 2013 el género *Phalaenopsis* se comercializó en el mundo como: planta viva, planta seca, raíces, cultivos, y derivados. Todas las plantas fueron propagadas artificialmente. El mayor importador fue República de Corea mientras que el mayor exportador fue China (CITES).

Las plantas comercializadas son híbridos derivados de ciertas especies de las cuales las más populares son: *P. amabilis*, *P. schilleriana* y *P. stuartiana* (Hiche *et al.*, 2004).

2.1.5.2 Mercado del género *Cattleya*

Este género tiene una importancia especial en América del Sur, ya que varios países tienen alguna especie como flor nacional, como *Cattleya mossiae* la flor nacional de Venezuela (Torres y Mogollón, 2000). Su impresionante labelo y el tamaño de las flores hacen imposible que pase desapercibida. Además muchas especies generan aromas dulces que la vuelven una flor exquisita.

En el 2013 el mercado internacional de este género registró a Holanda como el mayor importador y a Tailandia como el mayor exportador. Todas las plantas registradas fueron artificialmente propagadas. El mercadeo se realizó con plantas vivas generalmente, movilizándose también plantas secas, raíces, cultivos y flores.

El comercio más abundante es el de híbridos, aunque también se exportan e importan especies como: *C. aelandiae*, *C. amethystoglossa*, *C. araguaiensis*, *C. aurantiaca*, *C. bicolor*, *C. candida*, *C. dowiana*, *C. elongata*, *C. forbesii*, *C. labiata*, *C. máxima*, entre otros (CITES). México aún no entra al mercado internacional con este género.

2.1.5.3 México en el mercado ornamental

México produce diferentes especies de orquídeas como: la orquídea araña *Brassia* spp., el cimbido *Cymbidium* spp., *Encyclia mariae*, la orquídea estrella *Epidendrum* spp., el lirio de monte *Laelia* spp., la dama danzante *Oncidium* spp.,

Dendrobium spp., y la orquídea mariposa *Phalaenopsis* spp.; todas ellas propagadas por empresas especializadas en diferentes partes del país (Espinosa *et al.*, 2009).

La flora en México comprende 1 260 especies de las cuales 444 son endémicas. El mayor número de especies se concentra en los estados de Michoacán, Jalisco, Oaxaca, Chiapas y Veracruz, sin embargo para el 2010 se registraron 188 especies incluidas en alguna categoría de riesgo según la norma oficial vigente NOM-059-SEMARNAT-2010.

Según datos del SIAP 2008 las orquídeas son el cultivo con mayor valor de producción por hectárea generando 4 533 millones de pesos. En el periodo 2005-2009 se enviaron bulbos de orquídeas a Alemania y plantas vivas a Francia.

México no reportó en el 2013 participación en el mercado internacional de híbridos de orquídeas, pero sí aportó 368 ejemplares de Orchidaceae spp. como se puede observar en el Cuadro 2.3. Sin embargo, dicha cantidad no compite con las exportaciones de Tailandia, el mayor exportador de especies de esta familia (CITES).

Cuadro 2.3. Exportación registrada de Orchidaceae spp. en México en 2013 †.

Cantidad	Destino
218	Alemania
58	Rusia
35	China
18	EUA
15	Sudáfrica
13	Japón
6	Kazajstán
5	Indonesia

†Fuente: Base de datos sobre el comercio CITES, 2013.

En el país se está generando un gran impulso a la creación de Unidades de Manejo Ambiental (UMA) en las comunidades rurales donde se encuentran poblaciones de orquídeas silvestres, como alternativa para reducir la extracción ilegal de su hábitat natural. Sin embargo, es importante que estos viveros se vinculen con universidades o centros dedicados a la propagación masiva de plántulas para que provean a las UMAs de suficiente material para la demanda del mercado, y de esta manera poder conservar las especies al tiempo que se generan ingresos económicos para la región (Menchaca *et al.*, 2012). Algunos centros de propagación registrados en la red son: Orquídeas Río Verde - produce plantillas in vitro para productores afirma que lleva 30 años utilizando la técnica de micropropagación, in vitro orquid-productor independiente, vitroplantas - solo vende carnívoras aunque anuncia orquídeas y cactáceas; además de los centros educativos: Universidad Veracruzana y la Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo; así como el Instituto de Ecología (SINAREFI).

2.2 Propagación Tradicional de Orquídeas

2.2.1 Condiciones Generales de Cultivo

El cultivo general de orquídeas consiste en proveer un ambiente donde las condiciones climáticas creadas sean lo más equiparables al ambiente de la región de la cual provienen los ejemplares, para ello se debe tomar en cuenta principalmente factores de: luminosidad, aireación, humedad, temperatura, riego y fertilización.

Luz. En cuanto a los requerimientos de luminosidad se ha señalado que requieren de mucha luz, pero sin ser expuestas a los rayos solares, recomendándose

valores entre 200 a 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. **Temperatura.** La temperatura óptima de crecimiento se ubica entre 15 a 18°C durante la noche y de 21 a 30°C en el día. **Humedad.** Se recomienda mantener una humedad relativa por arriba del 50% y mantenerla debajo del 75%. **Riego.** El riego depende de la etapa de desarrollo, durante la época de crecimiento se recomienda un riego frecuente, mientras que en la época de reposo es favorable disminuirlo. Cuando la planta es adulta el sustrato necesita secarse completamente antes de la siguiente aplicación de agua, mientras que las plantas jóvenes requieren un poco más de humedad constante. **Fertilización.** La fertilización debe realizarse cada 15 días pero en concentraciones muy bajas, ya que requieren pequeñas cantidades puesto que su crecimiento es lento. Para *Phalaenopsis* se recomiendan aplicaciones de 15–30–15 NPK, mientras que para *Cattleya* se recomienda un fertilizante 25-9-9 NPK. **Plagas y enfermedades.** Son atacadas principalmente por pulgones, trips, cochinillas algodonosas y ácaros (Hiche *et al.*, 2004; Espinosa *et al.*, 2009).

Estos mismos factores deben tomarse en cuenta al momento de llevar a cabo una propagación. En especies epífitas, que corresponden a los géneros de nuestro ensayo, se lleva a cabo la propagación vegetativa, sin embargo es diferente para cada una.

2.2.2 Propagación de *Phalaenopsis*

Debido a su crecimiento monopodial este género no produce brotes, sin embargo bajo condiciones desfavorables de cultivo puede producir crecimientos vegetativos en las yemas de una inflorescencia llamados keikis, una palabra hawaiana que significa “niño pequeño”. Estos se desarrollan generalmente después

de la floración aunque la planta puede ser estimulada para que aparezcan estos hijuelos.

La técnica consiste en cortar la vara floral arriba de un nudo intermedio. Posteriormente se retiran las brácteas con una navaja flameada previamente permitiendo que las yemas queden expuestas a la luz (no al sol). En seguida se coloca con un ayuda de un pincel un poco de benciladenina disuelta en agua sobre la yema y se espera a que comiencen a crecer raíces sobre ésta. Por último se corta el nuevo crecimiento y se planta en macetas con un sustrato adecuado.

Una variación de esta técnica llamado pulso hormonal, es aplicar regularmente una plasta de lanolina mezclada con el regulador de crecimiento en una yema expuesta.

También es común que se realicen cortes de toda la vara floral separando las yemas en pequeñas estacas y colocarlas en sustrato humedecido de corteza y musgo, se tapan con un plástico para conservar la humedad y se revisan cada dos semanas para observar si hay crecimiento radicular (Pinaki *et al.*, 2010; Menchaca, 2011).

Es posible apreciar que cualquiera de estos métodos requiere una planta adulta que ya haya floreado, para lo cual debieron pasar al menos uno o dos años, y que las plantas que se obtienen son muy pocas por lo que ninguna de estas técnicas podría usarse de manera comercial para una producción masiva.

2.2.3 Propagación de *Cattleya*

Recordando que este género produce un pseudobulbo nuevo por año, es posible multiplicarla al poseer una gran cantidad de pseudobulbos para obtener

plantas nuevas. Se recomiendan entre tres o cuatro ya que existe un intercambio de nutrientes entre ellas. También es recomendable llevar a cabo el procedimiento en primavera o una vez que haya terminado la floración debido a que es el momento en el que tienen más nutrientes acumulados, lo que aumenta las posibilidades de sobrevivencia de las nuevas plantas.

La técnica consiste en separar las raíces con los dedos y con una navaja o cuchillo esterilizado en la flama, cortar la unión entre los pseudobulbos sin dañarlos, posteriormente colocar polvo de azufre en las heridas (o fungicida), y por último colocarlos en un contenedor con capacidad para el crecimiento de un año que tenga sustrato muy poroso para que las raíces nuevas puedan desarrollarse fácilmente (Menchaca, 2011).

Como puede apreciarse los inconvenientes de esta técnica son: que se requieren varios años para obtener una planta con muchos pseudobulbos que se puedan dividir, y además hay que esperar una época específica del año para que la propagación tenga éxito. Por mucho que se explotara la técnica no cubriría la demanda del mercado por lo que se requieren técnicas más competitivas ya que su propagación natural demanda mucho tiempo pues su crecimiento es muy lento lo que eleva los costos de su comercialización, además que sus especies se ven afectadas por la extracción ilegal de sus hábitats naturales; por lo que surge la necesidad de aplicar nuevas tecnologías para su propagación.

2.3 Cultivo de Tejidos Vegetales

La Red de Cooperación Técnica en Biotecnología Vegetal (REDBIO) de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) ha promovido desde 1990 el desarrollo y la utilización responsable de la biotecnología como una herramienta clave para el desarrollo competitivo y sustentable de la producción agropecuaria y forestal (Fernández *et al.*, 2013).

En México, la Comisión Nacional Forestal recomienda que quienes se dedican a la propagación de orquídeas incorporen a sus prácticas los nuevos conocimientos y tecnologías que surgen de la investigación, para reducir el riesgo al fracaso y lograr un aumento en su cantidad y calidad de producción (Menchaca, 2011).

Una herramienta de esta tecnología es el cultivo de tejidos vegetales, con el cual se han hecho valiosas aportaciones al conocimiento científico y es por eso una de las técnicas más utilizadas de la biotecnología vegetal, ya que permite la regeneración de plantas, la conservación, la colección *in vitro* de germoplasma y la aplicación de técnicas en conjunto para el mejoramiento. Muchos proyectos de investigación y desarrollo biotecnológico en esta área se orientan a la utilización, mejoramiento y conservación de los recursos naturales del país, para estos fines se utilizan la micropropagación o propagación clonal masiva, la conservación de germoplasma y el mejoramiento genético (Salgado, 2007). Sin embargo, si logramos combinar esta tecnología con el uso de recursos naturales de nuestro país podemos generar un aprovechamiento sustentable de los recursos a la vez que se generaría un impulso económico que podría cumplir con calidad de exportación. Además se

lograrían avances en investigación y se generarían fuentes de empleo a través de la coordinación entre industria y producción agrícola.

El cultivo de tejidos vegetales abarca un conjunto de técnicas empleadas para crecer tanto células como tejidos y órganos vegetales *in vitro*, esto quiere decir que se cultivan bajo condiciones asépticas, lo cual indica que se encuentran en condiciones controladas y libres de microorganismos. El desarrollo de estas técnicas ha sido posible al desarrollar el concepto de totipotencialidad, el cual indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta de la que proviene, no importando su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial de regenerar una nueva planta completa (Schaeffer, 1990; Calva y Pérez, 2005).

Las principales ventajas de esta técnica son: que los cultivos pueden almacenarse por largos periodos de tiempo (solucionando problemas de espacio, mano de obra, contaminación, erosión genética), además de permitir realizar estudios en un menor tiempo y bajo condiciones controladas.

2.3.1 Antecedentes Históricos

Estas técnicas han evolucionado muy poco desde 1898 cuando Gottlieb Haberlandt consigue aislar células y tejidos de plantas superiores para colocarlas en soluciones nutritivas y propone que era posible su cultivo y crecimiento al suplementarlas con extractos de ápices vegetativos o con fluidos de sacos embrionarios. Éste investigador introduce el concepto de totipotencialidad y es considerado como el padre de esta técnica (Krikorian y Berquam, 1969).

Posteriormente la identificación de los reguladores de crecimiento vegetal y el reconocimiento de la importancia de las vitaminas del complejo B en el crecimiento de las plantas repercuten de manera fundamental en el desarrollo de la técnica de cultivo de células y tejidos vegetales, sucesos que ocurrieron entre 1934 y 1939 gracias a Gautheret, White y Nobecourt. Los medios de cultivo y métodos utilizados actualmente son modificaciones de lo establecido en esas fechas (Street, 1977; Bhojwani y Rhazdan, 1983).

En 1948 Skoog realiza los primeros trabajos que permiten aislar e identificar el primer promotor de la división celular trabajando con tabaco, y en 1957 junto con Miller logran controlar la formación de brotes y raíces adventicias al usar combinaciones de auxinas y citocininas. En 1962 junto a Murashige determinan un medio para inducir y proliferar callos de tabaco (Skoog y Tsui, 1948; Skoog y Miller, 1957; Murashige y Skoog, 1962).

En el año 1964 se logró obtener una planta de zanahoria a partir de una sola célula cultivada in vitro en medio líquido en agitación (Steward *et al.*, 1964).

Aunque en un principio los aspectos sobre la diferenciación celular estaban llenos de incertidumbre, en la actualidad se sabe que esta regulada por la expresión genética (Calva y Pérez, 2005).

2.3.2 Descripción de la Técnica

La técnica conlleva varias etapas, la primera de ellas consiste en eliminar todo organismo que se encuentre en la superficie del explante, que es el fragmento de tejido u órgano vegetal que se cultivará (pueden ser protoplastos, células, tejidos u órganos). Para ello se emplean agentes desinfectantes como hipoclorito de sodio o

calcio y cloruro mercurioso, que se acompañan con agentes tensoactivos como el Tween 20 para incrementar la penetración en superficies rugosas o vellosas del tejido vegetal.

Posteriormente se inocula el explante en un medio de cultivo gelificado con agar, Gelrite o Phytigel bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar, para enseguida incubarse en condiciones ambientales de luz, temperatura y humedad controladas. Este nuevo ambiente conducirá al desarrollo del explante que puede tomar dos caminos: la formación de una masa amorfa de células indiferenciadas llamada callo, o la dediferenciación hacia un tejido nuevamente organizado que formará órganos o embriones que se conoce como morfogénesis (organogénesis y embriogénesis respectivamente).

Una vez obtenida una planta completa puede ser aclimatada a condiciones de invernadero, o seguir siendo fuente de más explante (Calva y Pérez, 2005; Mroginski *et al.*, 2010).

2.3.3 Condiciones de Cultivo

Para que las células del cultivo crezcan, se dividan rápidamente y expresen su capacidad de rediferenciación es necesario encontrar la mejor condición de cultivo, para ello se varían componentes del medio de cultivo y las condiciones físicoquímicas, en el cuadro 2.4 se pueden observar los componentes de algunos de los medios más comúnmente empleados en cultivo de tejidos vegetales.

Sales inorgánicas. Las formulaciones de sales inorgánicas varían, sin embargo algunas son las más utilizadas para el cultivo de tejidos como la formulación de Murashige y Skoog conocida como MS (Murashige y Skoog, 1962),

que contiene altas concentraciones de nitrato, potasio y amonio, con lo que se distingue de otras formulaciones. La fuente de nitrógeno más común es el nitrato de amonio, aunque también se emplea urea, hidrolizado de caseína, extracto de levadura y aminoácidos. El hierro debe ser incorporado con un agente quelante (Na_2EDTA) para que esté disponible en un amplio rango de pH. Se deben suministrar los mismos macro y micronutrientes que son esenciales para el crecimiento de las plantas enteras.

Reguladores de crecimiento. Este tipo de sustancias se pueden dividir principalmente en auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico, etileno, brasinoesteroides, poliaminas, ácido jasmónico y ácido salicílico. Las más empleadas en cultivo celular vegetal son las auxinas (ANA, 2,4-D, AIA, AIB, NOA, Dicamba, Picloram) y citocininas (BAP, KIN, ZEA, 2iP, Thidiazuron).

Auxinas. La más conocida es el ácido indol-3-acético o AIA, una hormona natural que se produce en los ápices de los tallos, meristemos y hojas jóvenes de yemas terminales para migrar al resto de la planta en forma basipétala por transporte activo polar a través de las células del floema y del parénquima del xilema, durante la circulación va reprimiendo el desarrollo de brotes axilares laterales a lo largo del tallo manteniendo así la dominancia apical. Además previene la abscisión moviéndose de la orilla de la lámina foliar hacia la base del peciolo. Su mecanismo de acción se sitúa en las membranas celulares donde modifica la permeabilidad modificando a la vez el funcionamiento celular y activando el metabolismo teniendo efecto sobre la división y el crecimiento celular, la atracción de nutrientes, así como relaciones hídricas y fotosintéticas.

Citocininas. Se producen en la zona de crecimiento, como los meristemos, y posteriormente se transportan de forma acropétala moviéndose a través de la savia del xilema estimulando la división celular. También poseen efecto de romper la latencia en yemas axilares. Existe un equilibrio natural entre auxinas y citocininas en los vegetales, sin embargo es preciso determinarlo para el cultivo *in vitro*.

Carbohidratos. La fuente de carbono más común es la sacarosa, en seguida la glucosa y por último están la maltosa, galactosa, almidón y melaza.

Otros compuestos. Es común la adición de aminoácidos como la glicina, L-tirosina, asparagina, cisteína. El carbón activado se añade para absorber metabolitos tóxicos para el cultivo. Agentes antioxidantes como el ácido cítrico, L-cisteína, ácido ascórbico, polivinilpirrolidona que previenen el ennegrecimiento de los tejidos causado por los polifenoles (Calva y Pérez, 2005; Mroginski *et al.*, 2010, Merino, 2014).

Cuadro 2.4. Componentes de algunos medios de cultivo para células y tejidos vegetales (Tomado de Calva y Pérez, 2005).

Componentes	MS ¹ Concentración	SH ²	B5 ³	White ⁴
Macronutrientes	mM	mM	mM	mM
NH ₄ NO ₃	20.6	25.0	--	--
KNO ₃	18.8	1.4	25.0	0.8
CaCl ₂ -2H ₂ O	3.0	1.6	1.0	--
Ca(NO ₃) ₂ -4H ₂ O	--	--	--	1.3
MgSO ₄ -7H ₂ O	1.5	--	1.0	3.0
Na ₂ SO ₄	--	--	--	1.4
(NH ₄) ₂ SO ₄	--	--	1.0	--
KH ₂ PO ₄	1.25	1.25	--	--
NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O	--	--	1.1	0.1
NH ₄ H ₂ PO ₄	--	2.6	--	--
Micronutrientes	μM	μM	μM	μM
KI	5.0	6.0	4.5	4.5
KCl	--	--	--	871.9
H ₃ BO ₃	100.0	80.0	48.5	24.3
MnSO ₄ -4H ₂ O	100.0	--	--	22.4
MnSO ₄ -H ₂ O	--	60.0	59.2	--
ZnSO ₄ -7H ₂ O	30.0	3.5	7.0	10.4
NaMoO ₄ -2H ₂ O	1.0	0.4	1.0	--
MoO ₃	--	--	--	0.0

CuSO ₄ -5H ₂ O	0.1	0.8	0.1	0.0
CoCl ₂ -6H ₂ O	0.1	--	0.1	--
Na ₂ EDTA	100.0	55.0	--	--
FeSO ₄ -7H ₂ O	100.0	55.0	--	--
Fe ₂ (SO ₄) ₃	--	--	--	6.3
Compuestos orgánicos	μM	μM	μM	μM
Myo-inositol	550.0	5500.0	555.1	--
Ácido nicotínico	4.6	40.6	8.1	0.4
Piridoxina HCl	2.4	2.4	4.9	0.0
Tiamina HCl	0.3	14.8	29.6	0.0
Glicina	26.6	--	--	40.0

¹Murashige y Skoog, 1962; ²Shenk y Hildebrandt, 1972; ³Gamborg, Miller y Ojima, 1968; ⁴White, 1963

2.3.3.2 Condiciones de laboratorio

La incubación de los cultivos debe estar lo más controlada posible en cuanto a temperatura, iluminación, fotoperiodo y humedad se refiere. Por lo general se incuban a temperaturas de 25-28°C con ciclos de luz/oscuridad de 16/8 horas. La luz se provee con lámparas fluorescentes con irradiancia entre 50-200 μmol m⁻² s⁻¹. La humedad se mantiene entre 80-90% (Mroginski, 2010).

2.3.4 Micropropagación

La micropropagación es una de las principales aplicaciones de la técnica de cultivo de tejidos vegetales. Consiste de varias etapas.

Establecimiento aséptico. Las condiciones de esterilidad de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales son fundamentales porque los medios empleados contienen nutrientes que facilitan el crecimiento de muchos hongos y bacterias. Estos microorganismos se desarrollan y multiplican a una velocidad mayor que las células vegetales, por lo que su crecimiento abundante y las toxinas que generan afectarían directamente el desarrollo de los tejidos vegetales. Por estas razones, la microflora que se encuentra en la superficie del material vegetal debe ser eliminada mediante

un agente desinfectante antes de realizar el corte del tejido u órgano que será empleado como explante.

Para que el agente desinfectante pueda entrar en contacto con el tejido vegetal se deben eliminar las grasas y la tensión superficial que se genera en la superficie. Para lo primero, se sumerge el explante unos segundos (dependiendo de la especie con que se trabaje, por lo general 30 segundos), este paso previo permitirá una mejor penetración del agente desinfectante. Para lo segundo se recomienda añadir un agente humectante, el más utilizado es Tween.

El agente desinfectante más adecuado, así como la concentración y el tiempo de inmersión deben ser determinados empíricamente para el material vegetal con el que se trabaje. Sin embargo, como es común en el método científico, una revisión de la literatura relacionada con el trabajo de investigación es de mucha ayuda y puede ser utilizada como una guía para definir dichas características. Las soluciones más comunes en el cultivo *in vitro* son el hipoclorito de calcio (CaClO) en concentraciones de 0.1 a 2%, hipoclorito de sodio (NaClO) de 2 a 6% (este puede obtenerse a partir de un blanqueador comercial, soluciones cloradas liberan al cloro como agente desinfectante), peróxido de hidrógeno (agua oxigenada), agua de bromo, nitrato de plata o plata coloidal y cloruro de mercurio (Merino, 2014).

Multiplicación. En esta etapa se busca la morfogénesis a partir del explante. En condiciones de cultivo *in vitro* las células somáticas pueden regenerar embriones (embriogénesis) o brotes, raíces y/o flores (organogénesis) como respuesta a un determinado estímulo. Esta regeneración comprende tres fases: fase de adquisición de la competencia, en la que las células adquieren la capacidad de responder al estímulo mediante un periodo de desdiferenciación; fase de inducción, en la que las

células son receptivas al estímulo y hay una relación directa entre el tipo, concentración y combinación de reguladores de crecimiento agregados al medio de cultivo y el órgano a desarrollar; y por último la fase de realización, en la que las células sufren las sucesivas divisiones para formar el órgano determinado.

Si la morfogénesis ocurre a partir del explante se conoce como morfogénesis directa, en cambio si ocurre a partir de la formación de callos o suspensiones celulares se conoce como morfogénesis indirecta (Radice, 2010).

Enraizamiento. En esta etapa una vez obtenido el órgano deseado, se hace un ajuste del regulador de crecimiento para estimular la proliferación de raíces para poder preparar a la nueva plántula para su posterior aclimatación.

Aclimatación. El cultivo debe pasar de una atmósfera interna con una concentración diurna de CO₂ variable, humedad relativa elevada, temperatura e intensidad lumínica bajas, concentraciones elevadas de azúcares, sales y reguladores de crecimiento, además de la ausencia de microorganismos, hacia el ambiente externo por lo que deberán adaptarse y corregir todas esas anomalías morfológicas, anatómicas y fisiológicas. La alta tasa de transpiración generada por el retraso en el desarrollo de la cutícula y la escasa funcionalidad del aparato estomático puede ocasionar la muerte por deshidratación. Para ello se debe controlar la deshidratación, así como estimular la fotosíntesis para generar un rápido crecimiento de las plántulas (Mroginski *et al.*, 2010).

2.4 Micropropagación de Orquídeas

La principal razón de usar la micropropagación en orquídeas es porque permite obtener clones somáticos a partir de los cuales se regeneran plantas completas con características uniformes.

Germinación aséptica. Una de los métodos de micropropagación en orquídeas en general, requiere obtener plántulas *in vitro* mediante la germinación aséptica, esto es porque existe una relación simbiótica muy importante en la familia Orchidaceae donde en algunos géneros representativos acompañan a la planta en todo su ciclo de vida (Kulikov y Filippov, 2001).

2.4.1 El Cultivo *in vitro* de *Phalaenopsis*

Se han desarrollado varios métodos de micropropagación mediante morfogénesis directa e indirecta en este género como la propagación clonal a través de cultivo de hojas, cultivo de yemas florales, así como la inducción de callo embriogénico y el cultivo de células en suspensión. Los principales tópicos a evaluar son el índice de sobrevivencia, la inducción de protocormos y la formación de plántulas, buscando una alta frecuencia de regeneración con la mayor homogeneidad entre plantas.

El cultivo de tejidos vegetales representa una solución para disminuir el tiempo de regeneración e incrementar las poblaciones para su comercio. Esta técnica se utiliza para la producción comercial de orquídeas, principalmente de los géneros *Phalaenopsis*, *Oncidium*, *Cymbidium*, *Dendrobium* y *Paphiopedium*, ya que permite obtener un gran número de plantas a partir de la germinación de semillas, o de algún tipo de explante (Chang y Chang, 1998; Flores *et al.*, 2008). Los explantes

comúnmente utilizados son segmentos de varas florales, segmentos de hojas, semillas maduras, rizomas, y cuerpos semejantes a protocormos (PLBs) (Chang y Chang, 1998; Nayak *et al.*, 2002; Feria *et al.*, 2007; Arditti, 2008; Salazar *et al.*, 2013)

Sin embargo, cada autor afirma con frecuencia proveer el mejor método de micropropagación para obtener una producción masiva con fines comerciales por lo que es difícil determinar mediante una revisión bibliográfica qué método es realmente el mejor ya que todos varían tanto componentes del medio de cultivo como explantes e incluso factores ambientales. Por ello y sumado a que en nuestro país no hay una amplia investigación al respecto, es necesario proveer resultados de experimentos realizados en México y adecuarlos a nuestras necesidades y recursos.

2.4.2 El Cultivo *in vitro* de *Cattleya*

Sobre este género se han enfocado esfuerzos a regenerar plántulas con fines de conservación, por lo que un protocolo que pueda proveer a los viveristas nacionales de esta orquídea es clave para incrementar la oferta de sus flores y nivelar la demanda comercial y con ello al mismo tiempo controlar la extracción de sus hábitats naturales.

Los principales métodos de micropropagación empleados incluyen la brotación axilar, y la producción de cuerpos protocórmicos, sin embargo mediante este último proceso se observa una mayor variación por lo que se prefiere la brotación axilar para garantizar la calidad de un programa de propagación con fines comerciales (Torres y Mogollón, 2000).

2.5 Diseño Experimental en la Experimentación *In Vitro*

Es común encontrar en la literatura relacionada con el cultivo de tejidos resultados con datos inconsistentes y con poca repetibilidad en los protocolos experimentales, y es que hay que recordar que las diferencias entre los individuos son debidas a diferencias genéticas y ambientales que se hallan fuera del control del experimentador, más difícil es aún evaluar una práctica que ha sido efectuada sobre una sola unidad experimental en condiciones de laboratorio.

Es por ello que se requiere una evaluación estadística de una colección de datos experimentales que permita hacer una estimación del efecto de los tratamientos sobre el material investigado y la evaluación de las diferencias obtenidas entre los tratamientos. En consecuencia, para conocer la magnitud de dichos efectos sobre el material biológico es necesario planear un experimento según criterios que fijen de antemano las hipótesis formuladas sobre él y los métodos específicos de llevarlo a cabo.

Para evaluar ciertas variables en cultivo de tejidos como la oxidación o la organogénesis se emplea estadística no paramétrica, comúnmente mediante una tabla de contingencia se examina la relación entre dos variables o se explora la distribución que posee una variable entre diferentes muestras. La independencia de dos variables es una cuestión que surge al examinar una tabla de contingencia y consiste en que la distribución de una de las variables es similar sea cual sea el nivel que examinemos de la otra, la prueba de independencia chi-cuadrado contrasta la hipótesis de que las variables son independientes frente a la hipótesis alternativa de que una variable se distribuye de modo diferente para diversos niveles de la otra.

Cuanto menor sea el valor del estadístico X^2 , más coherentes serán las observaciones obtenidas con los valores esperados. Por el contrario, valores grandes de este estadístico indicarán falta de concordancia entre las observaciones y lo esperado. En este tipo de contraste se suele rechazar la hipótesis nula (los valores observados son coherentes con los esperados) cuando el estadístico es mayor que un determinado valor crítico (Barón y Téllez, 2007).

Por lo general los experimentos en biotecnología tienen un diseño factorial en arreglos hechos completamente al azar debido a la sencillez una gran ventaja que se contrapone con las limitaciones impuestas por los gradientes ambientales que se generan; aunque se supone que las condiciones en una cámara de crecimiento son uniformes para todas las unidades experimentales en realidad están expuestas a condiciones locales y a gradientes de baja intensidad que pueden afectar la uniformidad con que cada factor ambiental llega a cada uno de los materiales ensayados en cada una de las unidades experimentales (Izquierdo y López, 1991).

El arreglo factorial se refiere a la constitución de los tratamientos que se quieren comparar lo que permite estudiar conjuntamente varios factores y si existe interacción. Las principales ventajas de este experimento es el obtener información sobre varios factores sin aumentar el tamaño del experimento, se amplía el rango de validez del experimento ya que se estudia en las diferentes condiciones representadas por los niveles de los factores, y permite el estudio de la interacción, esto es, la forma y grado en que se modifica el efecto de un factor por el nivel de otro.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación Geográfica

El experimento se desarrolló en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, ubicado en la unidad Marín, el cual se localiza en la carretera Zuazua-Marín Km 17.5 en Marín, Nuevo León (Ver Figura 3.1). Esta investigación se realizó en el periodo de agosto 2014 - julio 2016.

Las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología se encuentran ubicadas en las coordenadas: 25°52'26.7" latitud Norte y 100°02'43.1" longitud Oeste.



Fig. 3.1 Campus Marín de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Imágenes © 2016 DigitalGlobe, Texas Orthoimagery Program, USDA Farm Service Agency, Datos del mapa © 2016 Google). Vista frontal del Laboratorio.

3.2 Material de Estudio

El material vegetal utilizado fue:

- ***Phalaenopsis* spp.**

Fueron empleadas plantas maduras de cuatro variedades crecidas en condiciones de invernadero que corresponden a *P. amabilis*, *P. Kaleidoscope*, *P. Taisuco x Sogo*, *P. Taipei Gold* (Chang y Veilleux, 2009) las cuales se mantuvieron durante un mes en condiciones controladas de fotoperiodo de 16 horas luz y ocho de oscuridad bajo una intensidad lumínica de 24-27 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y temperatura 26°C $\pm 2^\circ\text{C}$ en un cuarto de aclimatación con riego y fertilización constante. De estas se utilizaron como fuente de explantes los escapos florales de cada planta.

Las plantas adultas mostraban las siguientes características florales:

Planta 1. Denominada “Blanca”. Pétalos y sépalos de color blanco, los pétalos son grandes, cortos y anchos y se encuentran colocados a los costados de la flor cubriendo casi por completo los sépalos inferiores, los cuales son más largos y angostos, el sépalo superior presenta la punta redondeada mientras que los inferiores tienen su punta más afilada y éstos últimos se encuentran más cerca entre ambos, el labelo es corto y presenta una tonalidad amarilla en el hipóquilo con un puntillero rojizo al centro, el epíquilo muestra un par de estructuras como alambres que se dirigen en forma curvada hacia el centro del labelo (Ver Figura 3.2 a).

Planta 2. Denominada “rayada”. Pétalos y sépalos son de color amarillo con las nervaduras entre rosadas y rojizas, los pétalos son redondeados y cortos mientras que los sépalos se distribuyen equitativamente y tienen las puntas marcadas pero redondeadas, el labelo presenta tonalidades rojizas en el epíquilo y

en el hipóquilo, pero no presenta los alambres de la blanca, solo unos picos cortos en la punta (Ver Figura 3.2 b).

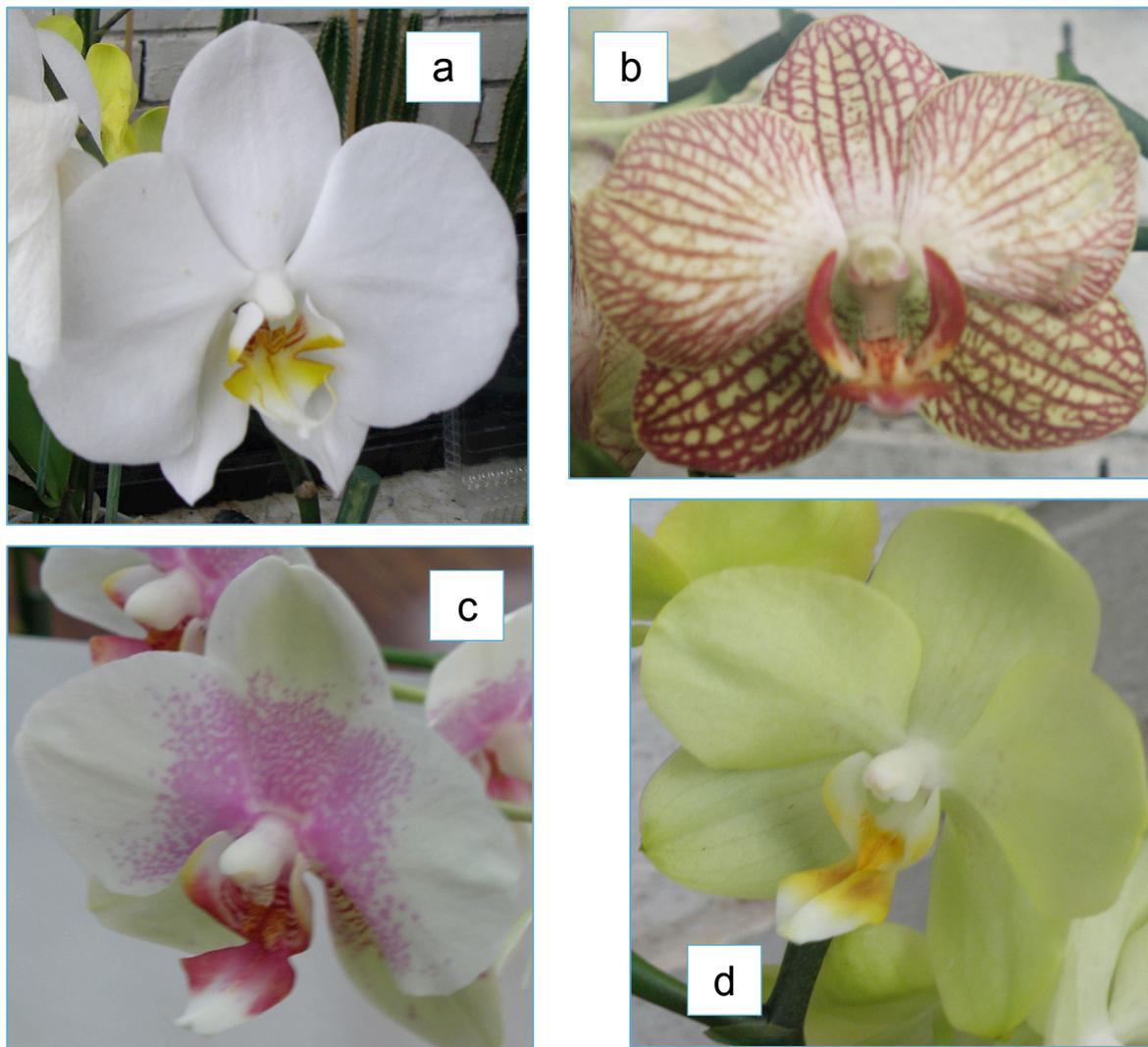


Fig. 3.2 a) orquídea blanca, b) orquídea rayada, c) orquídea rosa y d) orquídea amarilla.

Planta 3. Denominada “rosa”. Presenta pétalos y sépalos de color blanco con el centro punteado de color rosa, los pétalos son más puntiagudos que las anteriores, la abertura entre los sépalos inferiores es más pronunciada, el labelo presenta un color rosa intenso en el hipóquilo y epiquilo con un puntillero rojo, tampoco presenta

las estructuras de alambres al final de éste último sólo unos picos cortos (Ver Figura 3.2 c).

Planta 4. Denominada “amarilla”. Sus pétalos y sépalos son de color amarillo verdoso con el centro blanco, los pétalos son pequeños y están alejados de la columna, los sépalos también son pequeños y con las puntas redondeadas, el labelo es de color blanco con un poco de amarillo en el epiquilo, no presenta ninguna estructura en la punta de éste (Ver Figura 3.2 d).

De acuerdo con el estudio de Chang y Veilleux (2009) sobre la variación genética en especies e híbridos del género *Phalaenopsis* en el que emplearon la técnica de polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados, se estima que la orquídea blanca corresponde a la especie *P. amabilis*, aunque probablemente sea un híbrido de la misma, la orquídea rayada al híbrido *Phalaenopsis* Baldan’s Kaleidoscope Golden Treasure, la orquídea rosa al híbrido *Phalaenopsis* (Taisuco Windian x Sogo Yukidian), y la orquídea amarilla al híbrido *Phalaenopsis* Taipei Gold Golden Star. En dicho estudio se demuestra cómo ha variado la relación filogenética entre los cultivares de las especies *P. amabilis* y *P. lindenii* después de muchas hibridaciones como se puede observar en la Figura 3.3.

Así se tiene por ejemplo que la flor amarilla del cultivar Taipei Gold Golden Star se obtuvo después de ocho generaciones de hibridar las especies *P. amabilis*, *P. aphrodite* y *P. venosa*, mientras que para obtener la maravillosa flor rayada del cultivar Baldan’s Kaleidoscope Golden Treasure fueron necesarias 10 generaciones de relacionar las especies *P. amabilis*, *P. aphrodite*, *P. equestris*, *P. fasciata*, *P. lueddemanniana*, *P. sanderiana*, *P. schilleriana* y *P. stuartiana*, y para obtener esa combinación rosa y blanco en la flor del híbrido Taisuco Windian X Sogo Yukidian se

requirieron 11 generaciones de intenso cruzamiento entre las especies *P. amabilis*, *P. aphrodite*, *P. sanderiana*, *P. schilleriana* y *P. stuartiana*.

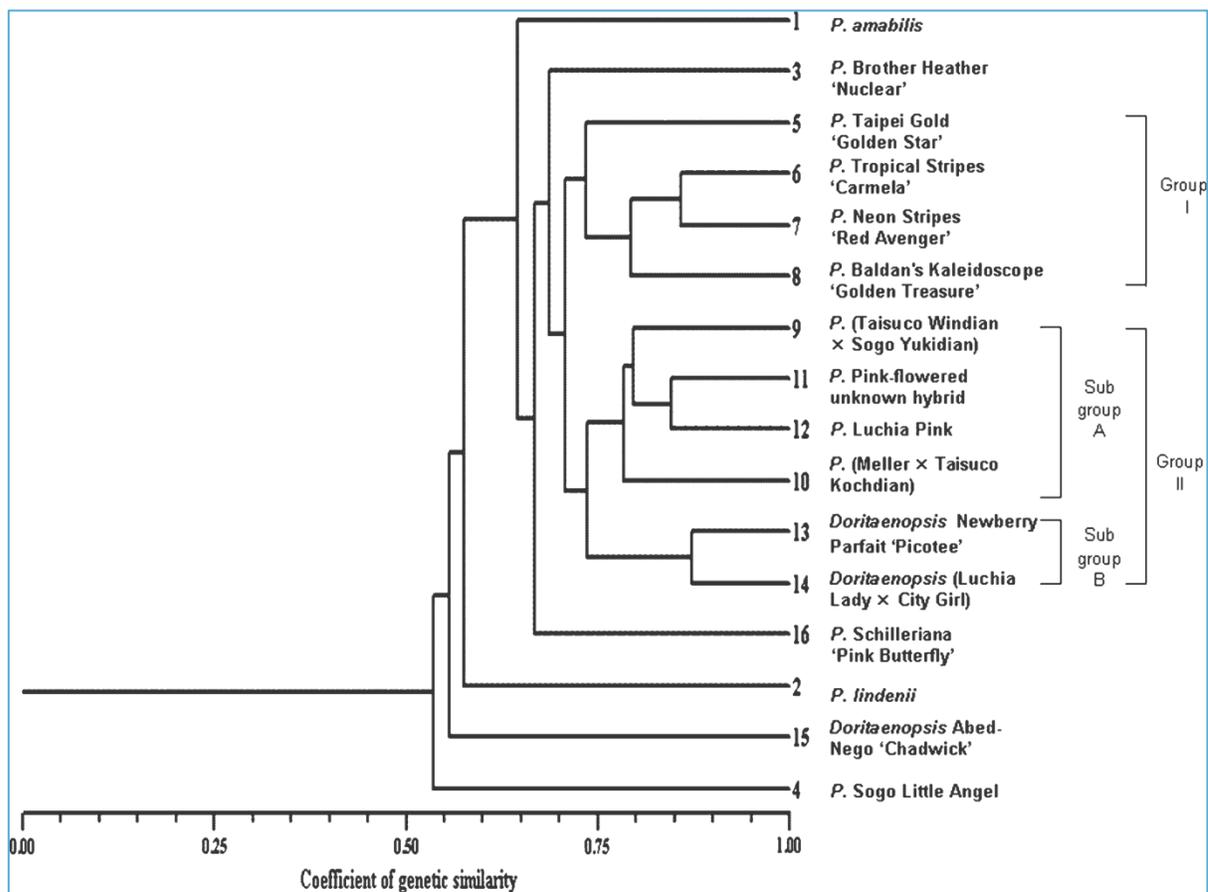


Fig. 3.3 Dendrograma de 16 especies e híbridos de *Phalaenopsis* generado con los datos del AFLP usando el coeficiente de Dice (S_D) de similitud genética. Tomado de Chang y Veilleux, 2009).

- ***Cattleya* sp.**

Se emplearon segmentos de hojas jóvenes provenientes de plántulas cultivadas *in vitro* de 24 meses de edad, y crecidas en el cuarto de incubación a 16 horas luz y ocho de oscuridad bajo una intensidad lumínica de $24 - 27 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y temperatura $24^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ propiedad del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la FAUANL.

El Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la FAUANL cuenta con un pequeño stock de plántulas *in vitro* del género *Cattleya*, se desconoce la especie pero se sabe que todas tenían alrededor de 24 meses de haberse establecido a partir de una sola planta y que fueron obtenidas mediante micropropagación siguiendo una ruta indirecta, sin embargo, en la Figura 3.4 se puede observar que las plántulas muestran un desarrollo no uniforme por lo que fue necesario seleccionar aquellas semejantes en crecimiento y desarrollo foliar y radicular.

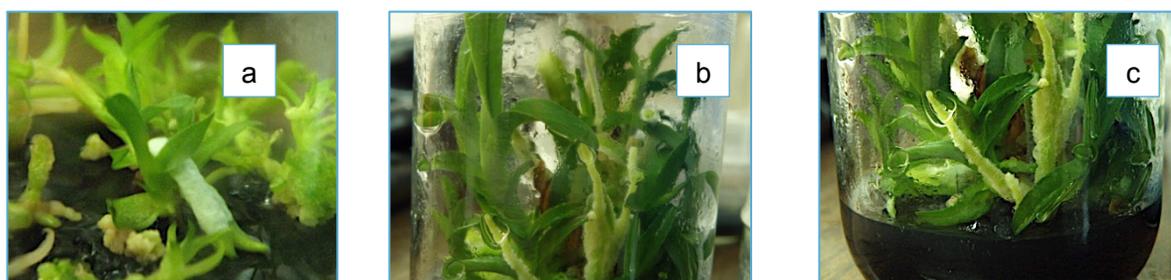


Fig. 3.4 Plántulas de *Cattleya in vitro* propiedad del Laboratorio de Biotecnología de la FAUANL. a) Plántulas muy pequeñas con poco desarrollo foliar y radicular, se observa variación en el desarrollo, b) y c) plántulas con mayor desarrollo foliar seleccionadas para el experimento.

3.3 Estudio *Phalaenopsis*

3.3.1 Obtención de Explantes

Yemas florales. Las varas florales fueron cortadas desde la base y segmentadas de tal manera que cada yema quedara en el centro y a cada extremo 1 cm de tejido vegetal, a excepción de las yemas apicales que solo llevan 1 cm debajo.

3.3.2 Establecimiento Aséptico

Este proceso consistió en desinfectar las varas florales iniciando con un lavado en una solución jabonosa para el cual se utilizó un cepillo dental de cerdas

suaves cuidando de no dañar el tejido vegetal, eliminando con cuidado las brácteas, y realizando un enjuague con agua corriente (Ver Figura 3.5). En seguida se sumergieron por 15 min en agua destilada con 15 gotas L⁻¹ de una solución de plata coloidal 0.32%.



Fig. 3.5. Varas florales de P. amabilis completas a la izquierda y segmentadas y sin brácteas a la derecha.

Posteriormente, como se muestra en la Figura 3.6, se trasladaron los explantes a condiciones asépticas dentro de una campana de flujo laminar en donde se suspendieron en etanol al 70 % por dos min; enseguida se pasaron a una solución de NaClO 1.0 % con dos gotas de tween 20 por cada 100mL en la que permanecieron en agitación por 10 min; concluido el tiempo se realizaron tres enjuagues con agua bidestilada estéril.



Fig.3.6. Establecimiento en condiciones asépticas. Izquierda: equipo dispuesto dentro de la campana de flujo laminar; centro: segmentos trasladados a la campana de flujo laminar; derecha: explantes listos en agua destilada estéril.

En caso de presentarse daño tisular en los bordes del explante éste fue retirado con un bisturí sobre una placa Petri.

Finalmente se establecieron los explantes en los medios de cultivo de cada tratamiento como se muestra en la Figura 3.7.

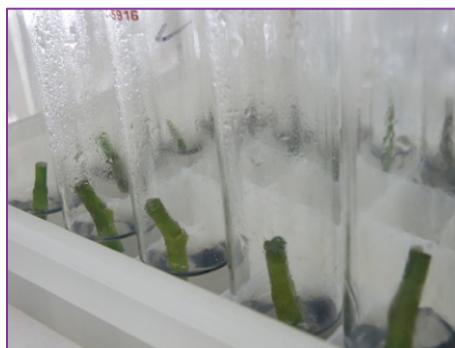


Fig.3.7. Establecimiento *in vitro* de los segmentos de varas florales en los medios de cultivo.

3.3.3 Medio de Cultivo.

El medio de cultivo basal consistió en las sales minerales de cada tratamiento (ver punto 3.3.3.1) complementadas con 100 mg L^{-1} de mioinositol, 0.1 mg L^{-1} de tiamina, 0.5 mg L^{-1} de ácido nicotínico, 0.5 mg L^{-1} de piridoxina, 2.0 mg L^{-1} de glicina, 30 g L^{-1} de sacarosa, 10 mg L^{-1} de ácido cítrico, 8 g L^{-1} de Agargel y se ajustó el pH a 5.8 ± 0.02 usando NaOH o HCl 1N; se esterilizaron en autoclave a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ a 15 libras de presión durante 15 minutos.

Las unidades experimentales *in vitro* se mantuvieron por 16 semanas en condiciones de incubación controladas bajo una intensidad lumínica de $24 - 27 \mu\text{M m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ con fotoperiodo 16 horas luz y ocho de oscuridad a una temperatura de $24^\circ\text{C} \pm 2$ $^\circ\text{C}$.

3.3.3.1 Experimento de sales minerales.

Para determinar las sales minerales más adecuadas se evaluaron cuatro medios de cultivo: MS al 50 % de sus sales, MS completo de sales, medio con sales de Knudson C, y una mezcla de dos Fertilizantes de Nitrógeno-Fósforo-Potasio (NPK) 18-09-18/15-30-15 con 1 g de cada uno.

3.3.3.2 Experimento de organogénesis.

Para evaluar la capacidad organogénica se establecieron dos tratamientos en medio MS al 50 % con diferentes reguladores de crecimiento: el primero empleando únicamente Bencil aminopurina (BAP) 20 μ M, y el segundo empleando una combinación de Bencil aminopurina (BAP) 20 μ M y Ácido naftalenacético (ANA) 5.37 μ M.

3.3.4 Diseño Estadístico.

Ambos experimentos quedan establecidos con un diseño estadístico completamente al azar el cual se expresa como $Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$; en el experimento de sales minerales se evalúa la variable de porcentaje de oxidación analizando los resultados mediante estadística no paramétrica con el método de Chi-cuadrada (X^2). En el experimento de organogénesis se evalúan las variables de porcentaje de inducción y número de brotes analizando los resultados mediante X^2 y análisis de varianza respectivamente. Se utiliza el programa estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) para el análisis de datos.

3.4 Estudio *Cattleya*

3.4.1 Obtención de Explantes

Se seleccionaron plántulas *in vitro* que contaran con 3 a 5 hojas y con 2 a 4 raíces, de las cuales se tomaron hojas de entre 2 a 4 cm de longitud.

Hojas. Las hojas fueron cortadas desde la base y horizontalmente de manera que quedara un segmento de 1 cm desde la punta y un segmento de 1cm desde la base.

3.4.2 Establecimiento *In Vitro*

Los segmentos de hojas fueron establecidos en placas Petri colocando hasta 10 segmentos por placa. Se distribuyeron y ordenaron los segmentos cuidando la posición de la hoja: Haz o Envés tocando el medio de cultivo (Ver Figura 3.8).



Fig. 3.8. Segmentos de hojas establecidos en los medios de cultivo. A la izquierda las hojas se encuentran colocadas con el haz tocando el medio de cultivo, a la derecha el envés es el lado que toca el medio.

3.4.3 Medio de Cultivo

Se utilizó el medio de cultivo MS con sales al 50% y se complementaron con vitaminas y aminoácidos: 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 0.1 mg L⁻¹ de tiamina, 0.5 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 0.5 mg L⁻¹ de piridoxina, 2.0 mg L⁻¹ de glicina. En todos los medios se utilizaron 30 g L⁻¹ de sacarosa, 10 mg L⁻¹ de ácido cítrico, 8 g L⁻¹ de

Agargel y se ajustó el pH a 5.8 ± 0.02 usando NaOH, KOH o HCl 1N; se esterilizaron en autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 15 libras de presión durante 15 minutos.

Las unidades experimentales *in vitro* se mantuvieron en condiciones de incubación controladas durante 16 semanas bajo una intensidad lumínica de 24 - 27 $\mu\text{M m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ con fotoperiodo 16 horas luz y ocho de oscuridad a una temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.3.1 Experimento con auxinas.

Se evaluaron cuatro concentraciones: 0.05, 0.5, 5, 25 μM de tres auxinas: Ácido indolacético (AIA), Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), Ácido naftalenacético (ANA).

3.4.3.2 Experimento con citocininas.

Se evaluaron cuatro concentraciones: 0.5, 5, 25, 50 μM de tres citocininas: Kinetina (KIN), Zeatina (ZEA), Bencil aminopurina (BAP).

3.4.3.3 Experimento con citocinina/auxina.

Se evaluaron cuatro concentraciones: 0.5/0.5, 0.5/5, 5/0.5, 5/5 μM de dos combinaciones de cit/aux: KIN/AIA, BAP/ANA.

3.4.4 Diseño Estadístico

Los tres experimentos quedaron establecidos bajo un diseño estadístico completamente al azar, con arreglo factorial AxB donde el factor A son los reguladores de crecimiento y el factor B son las concentraciones de regulador, para los experimentos de auxinas y citocininas se manejan 3x4 niveles (ver puntos 3.4.3.1

y 3.4.3.2), y para el experimento de combinaciones cit/aux se manejan 2x4 niveles, todos los experimentos se expresan como $Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$.

Los resultados se analizaron mediante estadística no paramétrica con el método de X^2 (Chi-cuadrada) para las variables de porcentaje de oxidación y porcentaje de morfogénesis, y mediante un análisis de varianza para las variables de número de brotes, además se evalúa la respuesta a los experimentos según la posición de la hoja, todo esto utilizando el programa estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estudio *Phalaenopsis*

4.1.1 Experimento de Sales Minerales

Transcurridos ocho días del establecimiento se obtuvo un 75% de sobrevivencia al método de desinfección empleado.

Respecto a los medios de cultivo se determina gran variabilidad en la oxidación de los explantes, considerando un explante oxidado aquel que pierde su coloración verde y cambia a tonalidades de amarilla a canela, con o sin necrosis, como se muestra en la Figura 4.1, ya que un tejido que no expresa el color verde es indicativo de ausencia de cloroplastos, organelos básicos para generar energía suficiente para las funciones celulares (Taiz y Zeiger, 2006). En ocasiones se observan secreciones de color café en el medio de cultivo (ver Figura 4.1), característico de compuestos fenólicos que al no poder dispersarse se mantienen atacando las células del explante continuamente, lo cual contribuye al aceleramiento del proceso de oxidación, por esta razón se decidió realizar subcultivos a medio nuevo cada 3 semanas. Con anterioridad, Brandelli y Lopes (2005) han demostrado la relación entre el oscurecimiento de duraznos (*Prunus persica*) y la actividad de la enzima polifenol oxidasa (PPO). Esta enzima se encarga de catalizar la reacción entre los compuestos fenólicos producidos por los explantes y el oxígeno molecular

generando quinonas, sustancias muy reactivas que inhiben el crecimiento, ocasionan daño o incluso la muerte del tejido (He *et al.*, 2009).



Fig. 4.1 Oxidación de explantes. Izquierda: Yema que presenta oxidación; centro: yema que se considera viable; derecha: compuestos fenólicos liberados al medio de cultivo

En el Cuadro 4.1 se muestran los resultados evaluados con el estadístico Chi-cuadrada determinando que la oxidación en los explantes depende del medio de cultivo utilizado.

Cuadro 4.1 Porcentaje de oxidación de explantes por medio de cultivo.

Medio de cultivo	Porcentaje de oxidación ^a
MS 50%	11%
Knudson C	67%
MS 100%	75%
Fertilizante	100%

^a $\chi^2 = 16.714$ con $p < 0.05$

Evaluando esta situación resalta el hecho que el MS 100 %, aunque es un medio muy completo al contener macro y micro elementos, es un medio con una alta cantidad de sales, y como menciona Krikorian (1991), esto puede ser sustentable para el crecimiento de ciertos cultivos que requieren concentraciones altas de iones, bajo el supuesto que todos los microelementos conocidos y necesarios para las plantas completas lo son también para las células y tejidos cultivados; sin embargo,

las orquídeas mantienen un bajo requerimiento mineral como afirma Gottschalk (2012), debido a que han evolucionado en algunos aspectos que las ayudan a sobrevivir en medios de poca disponibilidad de agua y nutrientes, como sus hojas gruesas, raíces con velamen, pseudobulbos, etc. (Fiatt, 2000). En contraste, el MS 50% resultó el medio más favorable para mantener la viabilidad de los explantes, manteniendo los mismos macro y micro elementos que el MS 100% pero a una concentración reducida. Por otro lado, el medio de Knudson también generó una alta oxidación de las yemas, aunque casi un 10% menor que el MS 100%; este medio mantiene la misma relación 1:2 de amonio:nitrato que el MS pero difiere en la fuente de nitrógeno, en el primero se aporta este elemento mediante el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ mientras que en el segundo se aporta como KNO_3 y NH_4NO_3 y es por ello que suele utilizarse para evaluar el crecimiento como respuesta a la nutrición nitrogenada (González *et al.* 2012), sin embargo, no contiene los microelementos que proporcionan las sales de MS, como el zinc, sodio y cobre, de los cuales gracias al estudio de Trelka *et al.* (2010), se sabe que se acumulan en raíces u hojas en cultivos de *Phalaenopsis* bajo técnica de hidroponía o bien cultivadas en sphagnum moss, por lo que esta deficiencia mineral pudiera haber afectado la sobrevivencia de las yemas. Por último, el medio elaborado con fertilizantes que presentó una oxidación completa de los explantes, mantiene una concentración de sales alta y tampoco suministra microelementos, así que no resultó una buena opción para el establecimiento *in vitro* de yemas florales de *Phalaenopsis*. Por su parte Menchaca (2011) menciona la importancia de aportar los microelementos en el cultivo normal de las orquídeas ya que un déficit en uno o más de ellos pueden producir alteraciones o una reducción de la absorción de los macronutrientes, resalta además que los

microelementos más importantes para estas plantas son el hierro, molibdeno, zinc, manganeso, boro y cobre.

En el cultivo de tejidos vegetales es de vital importancia seleccionar el medio de cultivo adecuado debido a que, un mismo explante puede tener diferente tipo de respuesta en el crecimiento dependiendo de los cambios en los componentes del medio (Smith, 2009). Diversas investigaciones como las de Park (2002) y Gow *et al.* (2008), en las que estudian diferentes respuestas *in vitro* en *Phalaenopsis*, han sido realizadas con predilección por el MS 50 % como medio basal, sin embargo, hacen falta estudios detallados de los requerimientos de microelementos en *Phalaenopsis* y en muchas otras orquídeas de interés comercial.

Con respecto a la variedad, en el Cuadro 4.2 se observa que la misma influye en la viabilidad de los explantes.

Cuadro 4.2. Porcentaje de oxidación de explantes por variedad de *Phalaenopsis*.

Variedades	Porcentaje de oxidación ^a
<i>Phalaenopsis</i> amabilis	25%
<i>Phalaenopsis</i> Taipei Gold	67%
<i>Phalaenopsis</i> Kaleidoscope	78%
<i>Phalaenopsis</i> Taisuco x Sogo	100%

^a $\chi^2 = 13.810$ con $p < 0.05$

Scalzo *et al.* (2005) demostró diferencias en el contenido de fenoles entre diferentes genotipos de fresa (*Fragaria x ananassa*), albaricoque (*Prunus armeniaca* L.) y durazno (*Prunus persica* L.); y Pequeño *et al.* (2015) relaciona el contenido de fenoles y la actividad de la PPO con el genotipo en *Jatropha curcas in vitro*. En este estudio se determina una gran variabilidad en la oxidación entre variedades, la cual

puede estar determinada por una diferencia en la actividad de la PPO según el genotipo de cada variedad. Aún cuando *P. amabilis* mantiene mayor adaptabilidad al establecimiento *in vitro* que los otros híbridos se deben considerar otros factores que no han sido evaluados en este experimento, como el estado fisiológico de las plantas madre, régimen de fertilización, riego, intensidad lumínica, humedad, etc., como en el que estuvieron en el invernadero de su procedencia, por lo que el estrés provocado por la alteración de estos y demás factores, sumado al traslado, dieron como resultado la acumulación de estrés en las plantas donadoras de explante, siendo éste notable tanto en la sequedad de sus raíces, como el marchitamiento de la punta de las hojas. George (2008) menciona que una elección adecuada del material vegetal puede tener un efecto importante en el éxito del cultivo de tejido. Es por ello que para reducir el estrés, se mantuvieron las plantas madre durante un mes antes del experimento en condiciones de aclimatación, con luz y temperatura controladas así como con riego y fertilización frecuente. Sin embargo, considerando el lento crecimiento característico de varios géneros de orquídeas como lo menciona Cumo (2013), se considera que el tiempo de aclimatación no fue suficiente para las demás variedades, por lo cual se sugiere extender el tiempo de aclimatación a 2 meses después de terminada la floración, pues en este momento la planta ha pasado por el gasto energético de la producción de flores y comienza un nuevo periodo de crecimiento vegetativo (Preece 2008). Por otro lado, Calva y Pérez (2005) aseguran que las plantas jóvenes o en desarrollo con tejidos meristemáticos y crecimiento vegetativo vigoroso son la mejor fuente de explantes. La edad fisiológica es un aspecto de gran influencia en la morfogénesis ya que mientras más joven e

indiferenciado se encuentre el tejido del explante la respuesta *in vitro* será mayor y mejor.

Así también se recomienda el uso de agentes antioxidantes durante el establecimiento como el ácido ascórbico, o de otros agentes como el carbón activado, los cuales son incorporados al medio de cultivo para controlar el proceso de oxidación (Ibarra *et al.*, 2016).

4.1.2 Experimento de Organogénesis

En el Cuadro 4.3 se muestran los resultados del experimento sobre la inducción de brotes, observando que la respuesta de los explantes depende del regulador empleado.

Cuadro 4.3. Porcentaje de inducción de explantes y número de brotes por explante de acuerdo al regulador de crecimiento empleado en *Phalaenopsis*.

Regulador de crecimiento	Porcentaje de inducción ¹	Número de brotes
BAP	5%	2.0 ^a
BAP/ANA	33%	2.4 ^a

BAP: Bencil aminopurina. **ANA:** Ácido naftalenacético. ¹ $\chi^2 = 16.714$ con $p < 0.05$. ^a Diferencia de medias por Tukey

La influencia de las auxinas y citocininas es evidenciada en los resultados de inducción puesto que una pequeña cantidad de auxina puede potencializar el efecto de la citocinina, tal como lo describe Krikorian (1991). A pesar de dichas afirmaciones y puesto que varias auxinas parecen tener diferentes sitios de acción, sería conveniente ensayar combinaciones más extensivas y evaluar diferentes auxinas con diferentes citocininas. Las propiedades del explante también rigen el crecimiento *in vitro*, pues está bien establecido que diferentes genotipos pueden no responder de la

misma manera aún cuando se encuentran en el mismo medio de cultivo, es por ello que han sido necesarios innumerables estudios empíricos para optimizar medios para diferentes especies e inclusive para cultivares de la misma especie puesto que la capacidad de regeneración es específica para cada especie (Salgado *et al.*, 2007; Preece 2008).

Los resultados obtenidos en la multiplicación resultan poco competitivos para una producción a gran escala que sea sustentable para los productores nacionales (ver Figura 4.2), ya que autores como Košir *et al.* (2004) y Gow *et al.* (2008a) han logrado obtener por organogénesis directa hasta 8 y 15 brotes por explante respectivamente.

Chen y Chang (2000) logran regenerar plantas completas a partir de callo inducido de protocormos derivados de semillas y los autores afirman no haber encontrado anormalidades fenotípicas en 200 de las plantas regeneradas, sin embargo la variación debería analizarse genotípicamente.

Por su parte Park y Paek (2000) utilizaron segmentos de hojas cultivadas en biorreactor logrando obtener hasta 1 000 protocormos por segmento con 15 mg L⁻¹ de BAP/1 mg L⁻¹ de ANA, por lo que probar otras técnicas de multiplicación también sería acertado aunque habría que considerar las capacidades de infraestructura del laboratorio.

En otro estudio Park *et al.* (2002) logra obtener a partir de yemas florales de *Phalaenopsis*, hojas jóvenes que emplea posteriormente como explante para obtener protocormos, con ello aunque el procedimiento requiere dos etapas, logra obtener hasta 13 protocormos en 12 semanas con 88.8 µM de BAP/5.4 µM de ANA.

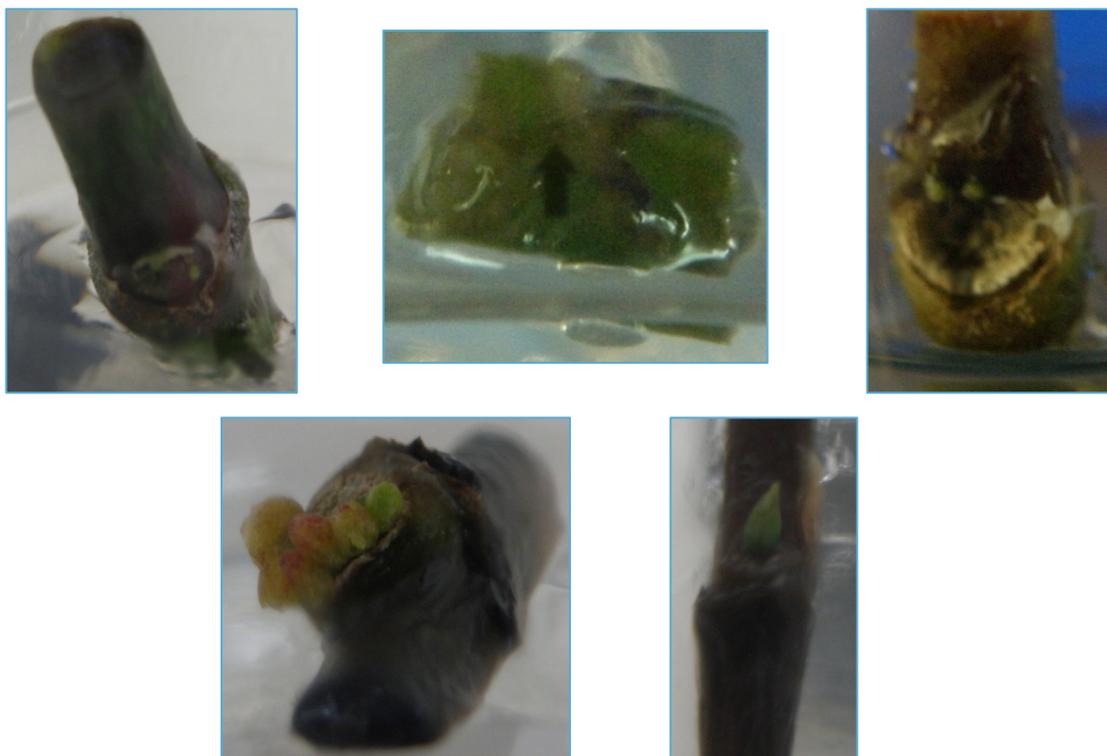


Fig. 4.2. Inducción de brotes en yemas de varas florales de *P. amabilis*. Arriba: brotes obtenidos a las 8 semanas después del establecimiento; abajo: brotes obtenidos a las 16 semanas después del establecimiento.

Nuevamente, aunque la causa puede ser multifactorial, se considera al estado fisiológico de las plantas donadoras el de mayor influencia ya que éste influye significativamente en la capacidad morfogénica del explante, además que los requerimientos nutricionales y hormonales difieren en los tejidos cultivados que provienen de plantas en diferentes edades fisiológicas (Villalobos y Torpe 1991). Calva y Pérez (2005) mencionan que las plantas adultas, tal como las empleadas en el estudio, pueden haber acumulado mayor cantidad de microorganismos en sus tejidos y contener menos células meristemáticas, necesarias para establecer los cultivos *in vitro*. No cabe duda que el éxito en la inducción está en función de la

calidad del explante usado, el cual a la vez depende de la planta madre o del tejido del que se inició el cultivo.

Otro factor importante es la elección de las yemas florales en la vara floral, en este estudio se emplearon todos los nudos florales, no obstante no se logró la desdiferenciación en las yemas terminales como se observa en la Figura 4.3.



Fig. 4.3. Yemas florales establecidas. Izquierda: yema durmiente del extremo superior de la vara floral; centro: yemas activas del centro de la vara floral; derecha: yema apical de la vara floral.

Jiménez y Guevara (1996) mencionan que las yemas intermedias son las más adecuadas y las que tendrán mayor posibilidad de resistir el proceso de establecimiento aséptico y producir un brote debido a que en ellas se concentran una mayor cantidad de reguladores endógenos, además consideran que el primer nudo basal no presenta yema axilar mientras que las yemas terminales tienen un alto grado de diferenciación hacia el estado reproductivo, por lo que las yemas intermedias son las más adecuadas para inducir el crecimiento vegetativo. Coincidiendo, Park *et al.* (2002) recomienda emplear entre el segundo y cuarto nudo del tallo floral a partir de la base y que contengan siempre una yema lateral diferenciada.

Por el contrario, Košir *et al.* (2004) obtiene una micropropagación rápida empleando nudos con yemas durmientes. Por otro lado, Mroginski *et al.* (2010) mencionan que la época del año es un factor importante al elegir yemas dado que

cada una presenta diferente grado de dormición, así como una mayor o menor proliferación de microorganismos.

Aunque otros factores físicos como la luz también deberían ser analizados, solo mediante una caracterización rigurosa del material biológico se puede estimar y comprender el rango y la magnitud de la variación. Es importante recordar al momento de seleccionar el material vegetal que el balance hormonal está asociado con el estado de desarrollo.

4.2 Estudio *Cattleya*

4.2.1 Oxidación

Si bien la oxidación es el proceso de pérdida de electrones en un átomo o grupo de átomos al cederlos a otro, en cultivo de tejidos se considera como el proceso por el cual los radicales libres de diferentes componentes celulares, o los compuestos fenólicos catalizados por la enzima PPO para producir quinonas (especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar), generan daño e incluso la muerte celular caracterizado por el oscurecimiento del tejido cultivado *in vitro* (Amiot *et al.*, 1996). La oxidación de los segmentos de hojas se muestra en la Figura 4.4.



Fig. 4.4. Oxidación de explantes. Izquierda: hoja que presenta oxidación; centro: hoja que se considera viable; derecha: compuestos fenólicos liberados al medio de cultivo

En el Cuadro 4.4 se muestran los resultados evaluados con el estadístico Chi-cuadrada observando que la oxidación en los explantes no depende del tipo de regulador empleado, obteniendo alrededor del 50% de sobrevivencia en los tres experimentos. Sin embargo, al compararlos con el grupo control se observa la influencia de la adición de regulador de crecimiento al medio de cultivo sobre la oxidación de los explantes.

Cuadro 4.4. Oxidación correspondiente a cada tipo de regulador de crecimiento.

Tipo de fitohormona	Regulador de crecimiento	Oxidación (%)	Total (%) ^a
Auxinas ^b	AIA	50.6	53.4
	2,4-D	47.6	
	ANA	60.9	
Citocininas ^c	KIN	50.0	48.2
	ZEA	41.4	
	BAP	53.6	
Cit/Aux ^d	KIN/AIA	64.0 ^{ea}	48.7
	BAP/ANA	34.9 ^{eb}	
Control	--	27.5	27.5

a: X^2 1.542 $p > 0.05$. b: X^2 3.429 $p > 0.05$. c: X^2 2.696 $p > 0.05$. d: X^2 13.317 $p < 0.05$. ea y eb: comparación de medias con el método de DMS $p < 0.05$

Se sabe que la producción de compuestos polifenólicos está influenciada por el regulador de crecimiento que se agrega al medio de cultivo, sin embargo su efecto y relación con el oscurecimiento de explantes no siempre es consistente (George, 1996; Van Staden *et al.*, 2006). Tanto auxinas como citocininas se han relacionado con el problema de oscurecimiento de los explantes colocando en primer lugar a las auxinas, en particular al 2,4-D, y luego a las citocininas por lo general a la BAP. Sin embargo la respuesta varía según la especie, en este estudio fue el ANA el que presentó mayor oxidación al igual que lo que reporta Mathur (1993) en *Nardostachys jatamansi*. Mientras que en las citocininas si se observa mayor oxidación en BAP aunque sin diferencia significativa con KIN y ZEA; la BAP se relaciona con

decoloración y oscurecimiento de los explantes al incorporarlo al medio de cultivo, aún cuando se sabe que previene o retrasa la degradación de la clorofila (Azofeifa, 2009). Al evaluar la oxidación sobre cada tipo de fitohormona se encuentra que la misma varía únicamente en el experimento de Cit/Aux, siendo la combinación KIN/AIA la que presenta mayor oxidación, lo cual resulta inesperado puesto que la auxina y citocinina que causaron mayor oxidación fueron las empleadas en la combinación BAP/ANA, por lo cual la interacción entre ambos reguladores afecta el potencial de oxidación individual de cada uno; los datos de estos dos tratamientos se transformaron mediante arco-seno para realizar un ANOVA encontrando que existe diferencia significativa entre las medias porcentuales de la oxidación en KIN/AIA y BAP/ANA.

En el Cuadro 4.5 se muestran los resultados de oxidación en cada regulador encontrando que ésta solo se ve influenciada por la dosis en los tratamientos con AIA y KIN en los que las dosis de 5µM para la auxina y de 0.5 a 25µM para la citocinina generan una oxidación igual o superior al 50%. Los tratamientos de ZEA y BAP/ANA mantienen un buen porcentaje de viabilidad.

Cuadro 4.5. Porcentajes de oxidación correspondiente a cada regulador de crecimiento de acuerdo a la concentración.

Regulador/Concentración (µM)	0.05	0.5	5	25	50
AIA ^a	35.0	45.0	85.0	36.8	--
2,4-D	35.0	47.4	65.0	43.5	--
ANA	63.6	59.1	42.9	74.1	--
KIN ^b	--	57.1	68.4	50.0	25.0
ZEA	--	43.5	45.5	40.0	36.4
BAP	--	45.5	75.5	45.5	50.0
Cit/Aux/Concentración (µM)	0.5/0.5	0.5/5	5/0.5	5/5	
KIN/AIA	52.6	77.8	73.7	52.6	
BAP/ANA	44.4	30.0	23.8	41.7	

a: X^2 13.105 $p < 0.05$. b: X^2 8.008 $p < 0.05$.

Con respecto a la posición del explante se evaluó la oxidación según sea el haz o el envés el lado que está en contacto con el medio de cultivo, los resultados se muestran en el Cuadro 4.6, de lo cual resulta que la orientación de la hoja no afecta la respuesta en cada tipo de fitohormona, sin embargo al analizar cada regulador se observa que la oxidación depende de la posición del explante en el tratamiento con BAP/ANA, mostrando una correlación de Spearman significativa, siendo preferible emplear el envés hacia abajo ya que se presenta menor oxidación de esa manera. Es importante determinar esta respuesta ya que en especies epifitas siempre es mayor el número de estomas en el haz que en el envés lo cual puede influir en la capacidad organogénica del explante.

Cuadro 4.6. Porcentajes de oxidación correspondiente a cada regulador de crecimiento de acuerdo a la posición de la hoja.

Regulador/Posición de hoja (% de oxidación)	Haz	Envés
Auxinas	50.8	55.7
Citocininas	49.2	47.2
Cit/Aux	50.0	47.5
AIA	48.7	52.5
2,4-D	47.6	47.5
ANA	56.1	64.7
KIN	48.7	51.2
ZEA	41.9	40.9
BAP	56.8	50.0
KIN/AIA	55.6	71.8
BAP/ANA ^a	45.2	24.4
Control	25.0	30.0

a: $X^2 = 3.967$ $p < 0.05$

Considerar la oxidación en un estudio de cultivo *in vitro* es clave puesto que compromete el éxito del establecimiento y del posterior resultado en los explantes ya que reduce la capacidad de regeneración de los mismos, por lo cual es necesario tener un buen método de control para la misma. En este estudio se empleo el ácido cítrico como antioxidante en una cantidad muy reducida, por lo que emplear una

concentración mayor del mismo compuesto o probar otros antioxidantes o agentes también son opción para reducir la oxidación aquí presentada. Acciones como minimizar heridas y realizar subcultivos con frecuencia de tres semanas resultaron buenas prácticas para el manejo de los explantes en este estudio.

4.2.2 Morfogénesis

Sabiendo que las técnicas más empleadas en la micropropagación con fines comerciales son la organogénesis y la embriogénesis somática, y que los reguladores de crecimiento empleados para su inducción son citocininas para la primera y auxinas para la segunda, los resultados esperados eran brotes formados *de novo* en el explante o embriones somáticos respectivamente. Sin embargo el crecimiento observado no puede afirmarse que sean embriones somáticos puesto que para ello es necesario determinar mediante técnicas histológicas si realmente no existe conexión con el tejido vascular del explante, las cuales no se pudieron realizar en este estudio. Es por ello que los resultados aquí presentados se hace mención a la morfogénesis en general. Además cabe aclarar que el patrón de reguladores empleados para cada técnica no es consistente puesto que hay reportes de especies que reaccionan de manera contraria al mismo, o bien que requieren de una combinación de ambas fitohormonas, y es común encontrar efectos contradictorios en la respuesta fisiológica asociada a cada etapa de desarrollo, sea vegetativa o reproductiva (Rojas *et al.*, 2009).

No obstante, se eligió un tejido con mayor probabilidad de contener células meristemáticas, las hojas jóvenes, a sabiendas que dichas células se diferencian rápidamente en respuesta a estímulos organogénicos como la variación en el tipo y

concentración de sustancias reguladoras de crecimiento, por ello el diseño de estos experimentos. A pesar que no fue posible obtener un estudio histológico de los brotes, cabe mencionar que las células meristemáticas se distinguen de otras células por su tamaño relativamente pequeño, citoplasma denso, forma isodiamétrica, pared celular fina, mínima vacuolación y un núcleo grande. Calva y Pérez (2005) comentan que este tipo de células se encuentran en la periferia de callos, en suspensiones o nódulos de tejidos preembriónicos lo que genera una gran variabilidad en la expresión genética, resultado no deseable cuando se busca la producción masiva de un solo cultivar, por lo que en este estudio se buscó la generación *de novo* de meristemas mediante una dediferenciación celular.

Aún así, de haber sido posible la observación histológica se buscarían meristemoides y células embrionarias como las mostradas por Radice (2010) en la Figura 4.5.

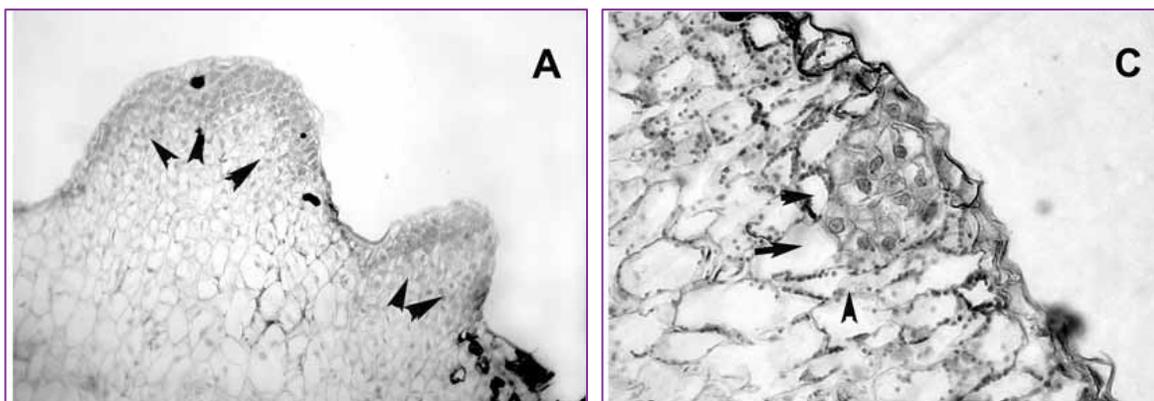


Fig. 4.5. Cortes histológicos de diferentes explantes cultivados *in vitro*. A: meristemoides (flechas) observados en cultivo de *Silybum marianum* L. en MS + 1 mg l⁻¹ de I mg l⁻¹ de B P 1 x ; C: grupo de células embriogénicas (flechas) en *Codiaeum variegatum* (L) Blume cultivados en 1 mg l⁻¹ de tidiazurón. 20 x . Tomado y modificado de Radice (2010).

Siendo así, se observa que la capacidad morfogénica del explante se incrementa dependiendo del tipo de fitohormona al cual sea expuesto éste, siendo el experimento de Cit/Aux el que presentan resultados óptimos, alrededor del 60% con una diferencia significativa respecto los otros dos experimentos. Al evaluar el nivel de inducción por cada regulador se observa que la capacidad morfogénica depende del tipo de citocinina empleada, siendo BAP la que presenta la mejor inducción. Calva y Pérez (2005) mencionan que de las citocininas las más empleadas son BAP y KIN (aunque ésta última se degrada con la luz a longitudes de onda de 300-800nm), a pesar que la más activa es la 2-indolaminopurina (2iP), no empleada en este estudio; y con respecto a las auxinas, la más empleada es el 2,4-D pero para inducir y mantener tejido calloso, que no era el objetivo, sin embargo los explantes tratados con esta auxina no presentaron este tipo de crecimiento y algunos si lograron desarrollar brotes a pesar de que estos autores afirman que suprime severamente la organogénesis. En *Phalaenopsis* Gow *et al.* (2008) demostraron que las auxinas 2,4-D, AIA, AIB y ANA retardan en gran medida la embriogénesis a partir de hojas jóvenes, mientras que Chen y Chang (2001) reportaron un papel inhibitorio de las auxinas exógenas en la formación de embriones en las orquídeas *Oncidium* y *Dendrobium*. Algunos brotes y la evolución del crecimiento se muestran en las Figuras 4.6, 4.7, 4.9, 4.10 y 4.11.

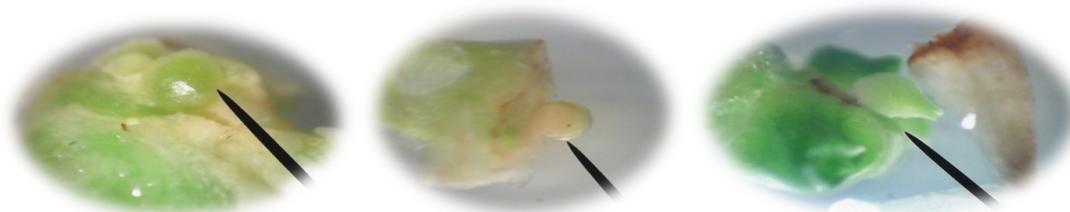


Fig. 4.6. Brotes formados de novo en la parte basal de hojas jóvenes.

Por otro lado la capacidad morfogénica no depende del tipo de auxina o del tipo de combinación Cit/Aux, como se observa en los resultados del Cuadro 4.7. Krikorian (1991) menciona que una pequeña cantidad de auxina puede potencializar el efecto de la citocinina en la multiplicación de brotes, dicho efecto se observa en la combinación KA pero no en la combinación BAP/ANA en la cual se observa una pequeña reducción de la capacidad morfogénica con respecto a la citocinina sola BAP lo cual puede deberse a la baja capacidad morfogénica obtenida del regulador ANA en esta especie de orquídea; por lo cual hacer combinaciones de BAP con diferentes dosis de otras auxinas puede ser una opción viable para optimizar la inducción morfogénica de la orquídea *Cattleya* puesto que varias auxinas parecen tener diferentes sitios de acción. Torres y Mogollón (2000) incrementaron la proliferación de brotes de *C. mossiae* a partir de ápices caulinares de yemas en reposo tipo A (las producidas en el último flujo de crecimiento), al incrementar cantidades de tiazuron encontrando una concentración óptima a los 3.3 μ M obteniendo hasta 10 brotes.

Cuadro 4.7. Morfogénesis correspondiente a cada tipo de regulador de crecimiento.

Tipo de fitohormona	Regulador de crecimiento	Morfogénesis (%)	Total (%) ^a
Auxinas ^b	AIA	35.9	28.8 ^{eb}
	2,4-D	32.6	
	ANA	16.7	
Citocininas ^c	KIN	22.5 ^{tb}	36.2 ^{eb}
	ZEA	22.9 ^{tb}	
	BAP	66.7 ^{fa}	
Cit/Aux ^d	KIN/AIA	59.3	61.7 ^{ea}
	BAP/ANA	63.0	
Control	--	0.0	0.0

a: X^2 22.864 $p < 0.05$. b: X^2 3.838 $p > 0.05$. c: X^2 22.586 $p < 0.05$. d: X^2 0.105 $p > 0.05$. ea, eb, fa y fb: comparación de medias con el método de Tukey $p < 0.05$

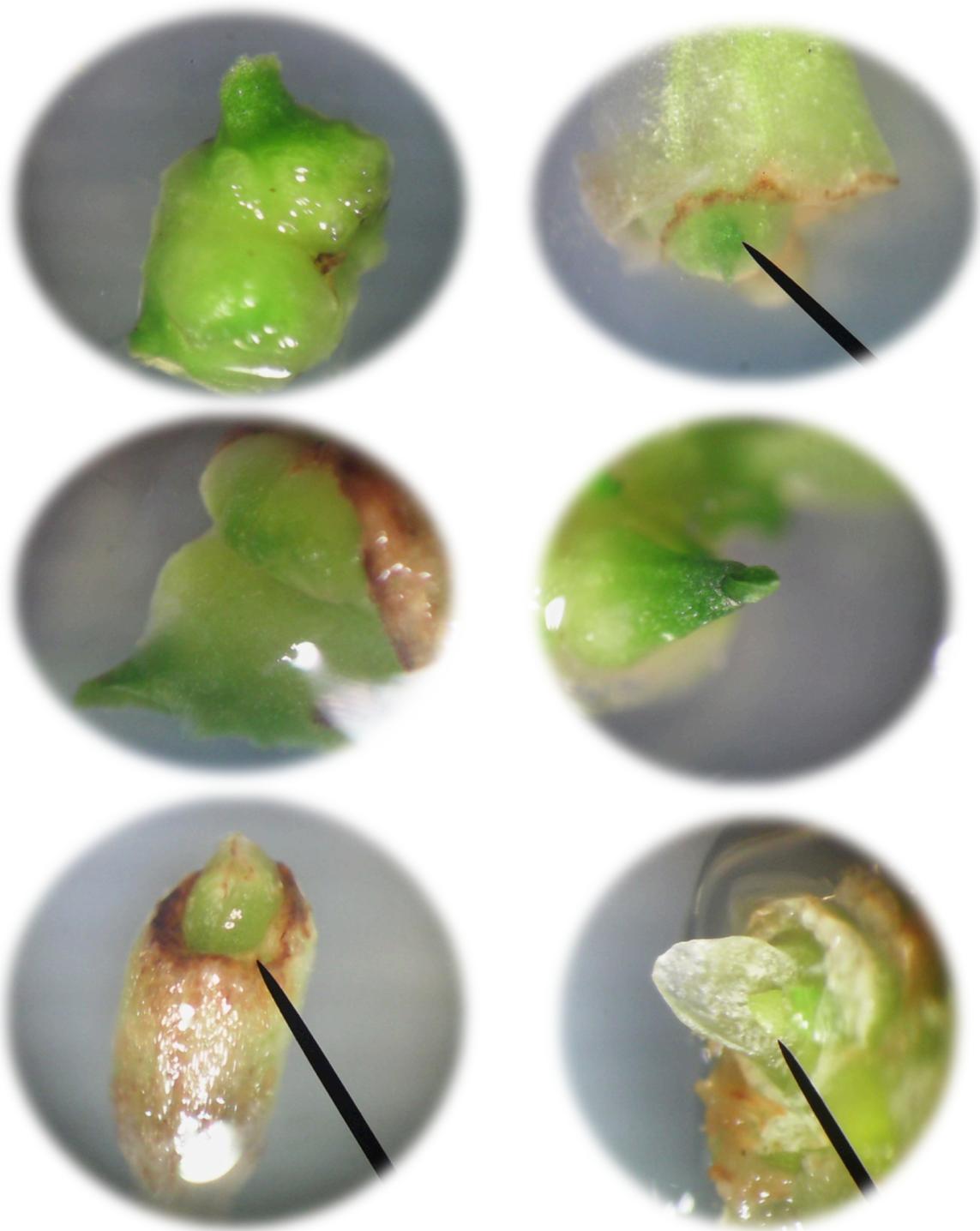


Fig. 4.7. Primordios foliares en brotes formados de novo en explantes de hojas jóvenes. Arriba a la izquierda los brotes se han separado del explante.

Con respecto a la concentración, los resultados se muestran en el Cuadro 4.8, observando que la morfogénesis únicamente varía en el tratamiento con BAP/ANA siendo las dosis 0.5/0.5 μ M y 5/0.5 μ M las óptimas con altos niveles de inducción. Esto indica que una baja cantidad de ANA resulta más favorable con cualquiera de las dosis de BAP.

Es importante evaluar varias concentraciones para poder elegir la cantidad adecuada del regulador que genere una mayor inducción de brotes puesto que sabemos que el efecto del regulador dependerá de la concentración dentro del tejido del explante, la cual a su vez depende de factores como el transporte, la síntesis y la degradación endógenas del regulador. En cultivos de callo se ha demostrado que las concentraciones de auxina y citocinina determinan la formación de raíces o yemas, si la concentración de auxina es más elevada se forman raíces y si es al contrario se forman yemas, y si ambas concentraciones son similares el callo continúa produciendo células indiferenciadas (Raven *et al.*, 1992).

Cuadro 4.8. Porcentajes de morfogénesis correspondiente a cada regulador de crecimiento de acuerdo a la concentración.

Regulador/Concentración (μ M)	0.05	0.5	5	25	50
AIA	23.1	45.5	33.3	41.7	--
2,4-D	30.8	20.0	71.4	23.1	--
ANA	25.0	22.2	0.0	28.6	--
KIN	--	11.1	50.0	0.0	33.3
ZEA	--	23.1	11.1	25.0	28.6
BAP	--	75.0	80.0	58.3	60.0
Cit/Aux/Concentración (μ M)	0.5/0.5	0.5/5	5/0.5	5/5	
KIN/AIA	33.3	75.0	100.0	55.6	
BAP/ANA ^a	80.0	28.6	93.8	50.0	

a: X^2 15.858 $p < 0.05$.

El porcentaje de inducción de brotes se muestra en el Cuadro 4.9 en donde se observa que éste también depende de la posición de la hoja en los tratamientos con

BAP/ANA donde el envés resulta con una mayor capacidad morfogénica; así mismo los tratamientos con AIA, BAP/ANA y KIN/AIA muestran correlación en algunas concentraciones con la posición de la hoja como se muestra en el Cuadro 4.10. En el tratamiento con AIA al utilizar una dosis baja de auxina resulta más favorable emplear el envés tocando el medio de cultivo, pero si la dosis se incrementa es mejor emplear el haz. En el tratamiento con KIN/AIA cuando AIA está a mayor concentración que KIN es mejor colocar el haz hacia abajo, y si ambos reguladores se encuentran en alta concentración es mejor emplear el envés hacia abajo. En el tratamiento con BAP/ANA solo influye la posición si ambos reguladores se encuentran en baja concentración siendo óptimo emplear el haz hacia abajo. Victoriano (2010) menciona que la orientación del explante es un factor importante en la respuesta morfogénica en explantes de arándano encontrando mayor respuesta con el haz tocando el medio de cultivo, además obtiene una mayor regeneración de brotes en los segmentos medios y basales que en los segmentos apicales de la hoja, lo cual se atribuye a que en la región basal se encuentra un mayor número de células meristemáticas que en la región distal (ver Figura 4.8). En este estudio se emplearon varios explantes de una misma hoja y se estima que una parte de las variaciones entre los resultados de inducción se deben a esta cuestión.



Fig. 4.8. Explante de hoja joven mostrando la parte basal de la hoja del grupo control al final del experimento. Obsérvese la oxidación y ensanchamiento del tejido pero ningún brote.

Cuadro 4.9. Porcentajes de morfogénesis correspondiente a cada regulador de crecimiento de acuerdo a la posición de la hoja.

Regulador/Posición de hoja (% de morfogénesis)	Haz	Envés
Auxinas	31.7	25.9
Citocininas	35.9	36.5
Cit/Aux	51.3	71.4
AIA	45.0	26.3
2,4-D	31.8	33.3
ANA	16.7	16.7
KIN	20.0	25.0
ZEA	24.0	21.7
BAP	68.4	65.0
KIN/AIA	56.3	63.6
BAP/ANA ^a	47.8	74.2

a: $X^2 = 3.937$ $p < 0.05$

Cuadro 4.10. Porcentajes de morfogénesis correspondientes a los reguladores que muestran correlación en alguna concentración con la posición de la hoja.

Regulador	Concentración (μM)	Posición de hoja (% de morfogénesis)	
		Haz	Envés
AIA	0.05 ^a	0.0	100.0
	0.5 ^b	100.0	14.3
	5	0.0	50.0
	25 ^c	100.0	0.0
KIN/AIA	0.5/0.5	40.0	25.0
	0.5/5 ^d	100.0	0.0
	5/0.5	100.0	100.0
	5/5 ^e	20.0	100.0
BAP/ANA	0.5/0.5 ^f	0.0	100.0
	0.5/5	80.0	44.4
	5/0.5	85.7	100.0
	5/5	55.6	40.0

a: X^2 13.0 $p < 0.05$. b: X^2 7.543 $p > 0.05$. c: X^2 12.0 $p < 0.05$. d: X^2 4.0 $p > 0.05$. e: X^2 5.76 $p < 0.05$. f: X^2 10.0 $p > 0.05$

El número de brotes se muestra en el Cuadro 4.11 observando que no difiere significativamente entre los diferentes tipos de reguladores empleados. Sin embargo existe diferencia significativa entre el número de brotes de las citocininas siendo ZEA la más óptima para la producción de brotes; así también existe diferencia entre las combinaciones Cit/Aux siendo BAP/ANA la óptima. Mientras que no existe diferencia significativa entre las auxinas.

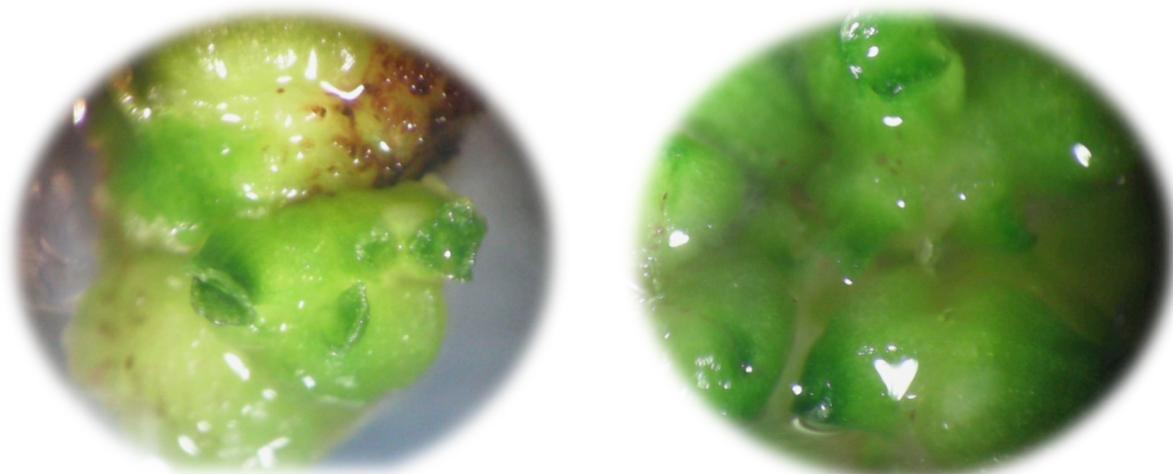


Fig. 4.9. Brotes completamente diferenciados de la sección de hoja de donde surgieron, muestran un primordio foliar sin embargo aún no se distingue el primordio radicular.

Cuadro 4.11. Número de brotes por explante con respuesta de acuerdo al regulador empleado.

Tipo de fitohormona	Regulador de crecimiento	No. De brotes por explante con respuesta	Total (%)
Auxinas	AIA	1.7	1.7
	2,4-D	1.6	
	ANA	2.0	
Citocininas	KIN	1.8 ^b	2.0
	ZEA	2.5 ^a	
	BAP	1.8 ^b	
Cit/Aux	KIN/AIA	1.6 ^b	2.2
	BAP/ANA	2.4 ^a	

a y b: Comparación de medias con el método de Tukey $p < 0.05$

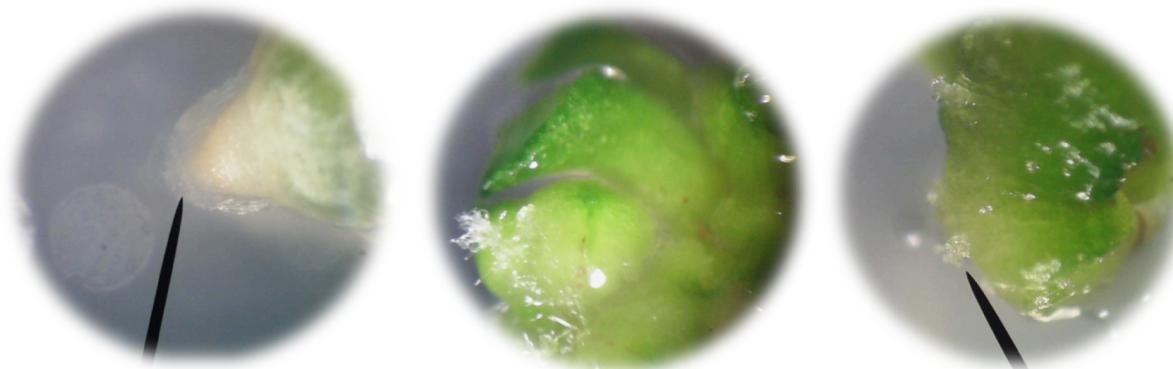


Fig. 4.10. A la izquierda Primordio foliar de uno de los brotes nuevos. Se puede notar alrededor la formación del velamen. Al centro y a la derecha Pelos radiculares que sirven para absorción de nutrientes pero aún no se diferencia la raíz, también se aprecia el ápice foliar.

No se presentó diferencia significativa en ningún tratamiento entre el número de brotes y las dosis o la posición de la hoja.

Haciendo un análisis general de todos los resultados se determina que la combinación BAP/ANA es la óptima para la micropropagación de hojas de *Cattleya* puesto que a pesar de los buenos resultados de ZEA en cuanto a números de brotes y alta viabilidad, y de BAP en cuanto a porcentaje de inducción de explantes, la combinación BAP/ANA muestra el mejor equilibrio entre las variables evaluadas. No se reporta una estimación de concentración óptima puesto que el mejor coeficiente de regresión no lineal fue de tipo cuadrática de 0.386, lo que solo estaría explicando el 38% de la variación del número de brotes en función de la concentración del regulador de crecimiento.

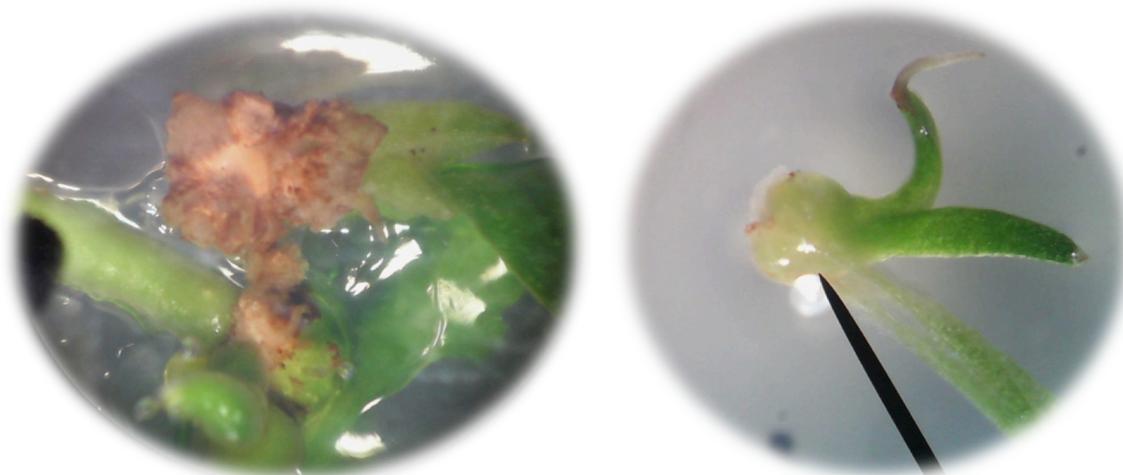


Fig. 4.11. . Brotes obtenidos de novo a partir de hojas jóvenes. Se puede notar aún los vestigios de las hojas que fueron establecidas.

Otros autores han reportado el buen resultado obtenido utilizando combinaciones de Cit/Aux. Ávila y Salgado (2006) obtuvieron protocormos de diferentes géneros de orquídeas con ANA/BAP 0.25-1.0 y 0.5-2.5mg L⁻¹

respectivamente. Otras orquídeas como *Laelia anceps* requieren dosis mayores de reguladores de hasta 8 mg L^{-1} en la combinación ANA/BAP 1:1 (Ramirez, 1999).

Por el tipo de explante empleado en este estudio, hojas jóvenes, se esperaban resultados como formación de callo debido a que en estos tejidos hay una mayor síntesis de citocininas las cuales en presencia de auxinas generan este tipo de crecimiento, sin embargo en ningún explante se presentó callo. Cabe considerar el tipo de medio empleado para las respuestas morfogénicas puesto que al emplear hojas aún cuando el tamaño del explante es pequeño existían zonas del mismo que no estaban en contacto con el medio semisólido, por lo cual se sugiere trabajar con medio líquido, en doble fase o bien empleando el sistema RITA de inmersión temporal, con los cuales se tendría un mayor control y uniformidad sobre el regulador de crecimiento que en realidad penetra en el explante como lo menciona Tirado *et al.* (2005) en su empleo con *Phalaenopsis*.

También, hay que recordar que algunos de estos resultados pudieran corresponder a embriones somáticos en los que para su formación hubo de tener lugar un cambio morfológico y bioquímico en respuesta a alguna alteración en la pauta de la expresión génica. Calva y Pérez (2005) afirman que las condiciones fisicoquímicas y nutricionales actúan sobre los cultivos para orientar la expresión genética de las células a diversos grados de diferenciación aún cuando tienen como origen una misma planta o incluso un mismo explante. Un ejemplo claro es el nivel de expresión del gen SERK (receptor tipo proteína quinasa de la embriogénesis somática) el cual está asociado con la inducción de la formación de embriones somáticos (Meijomin *et al.*, 2010; Cueva *et al.* 2012). Por lo que es necesario un estudio multidisciplinario que ahonde en estos datos y genere mejores resultados con

miras a una producción masiva, a la vez que se genera un mejor entendimiento de los aspectos que determinan e incrementan el número de explantes que responden a las técnicas de micropropagación.

Los resultados obtenidos pueden ser dirigidos hacia un programa de producción de la orquídea *Cattleya* en el mercado local, ya que por cada plántula *in vitro* se pueden generar de 7.5 a 12.5 orquídeas adultas o bien pueden seguir siendo donadoras de explantes hasta incrementar un stock de plántulas suficiente para comercializar (Ver Figura 4.12).

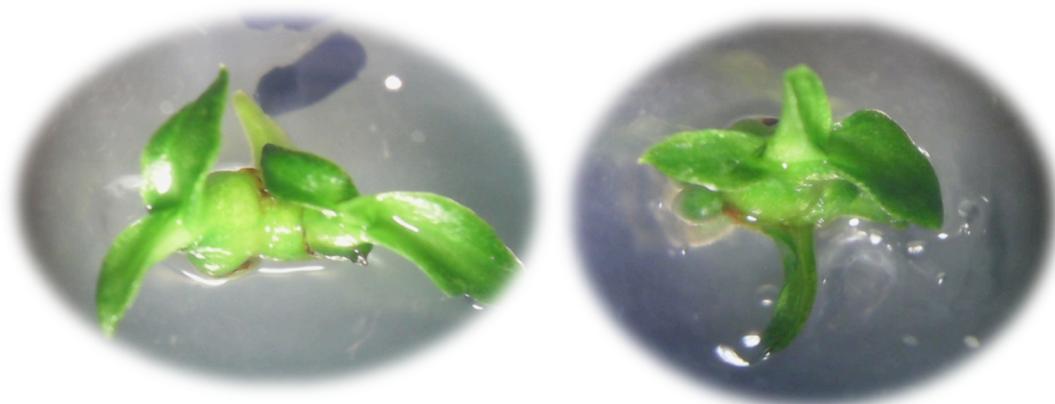


Fig. 4.12. Plántulas regeneradas in vitro a partir de hojas jóvenes obtenidas a los cuatro meses de su establecimiento

5. CONCLUSIONES

La organogénesis en las orquídeas *Phalaenopsis* spp. y *Cattleya* sp. se obtiene cuando se establecen sus explantes en el medio de cultivo adecuado y con un correcto balance hormonal, por lo tanto, la atención a factores como la combinación e interacción de los reguladores de crecimiento, y sus concentraciones durante el cultivo de sus tejidos, permitió la multiplicación clonal *in vitro* de estas orquídeas.

Con respecto al primer experimento de la orquídea mariposa se concluye que:

1. Las sales minerales empleadas en los medios de cultivo así como la variedad de orquídea *Phalaenopsis* influyen significativamente en la oxidación de los explantes.
2. La mayor viabilidad de los explantes se logra con el medio MS 50 %.

Con respecto al segundo experimento de la orquídea mariposa se concluye que:

1. Los balances hormonales empleados, ya sea BAP 20 μ M o bien BAP 20 μ M/ANA 5.37 μ M, permiten la inducción de brotes en las yemas florales de esta orquídea.
2. Sin embargo, la combinación de ambos reguladores incrementa significativamente la inducción. Por lo tanto es más conveniente combinar los reguladores para obtener mayor número de explantes con respuesta con un buen número de brotes.

Con respecto al experimento de la orquídea *Cattleya* se concluye que:

1. La oxidación de los explantes varía dependiendo de diversos factores, en este estudio la combinación Cit/Aux, la concentración de algunos reguladores, y la orientación de la hoja en el medio de cultivo en un tratamiento son características que deben considerarse para controlar la oxidación.
2. La capacidad organogénica del explante se mejora: al combinar citocininas y auxinas; y al emplear la citocinina BAP.
3. El mayor número de brotes se obtiene utilizando ZEA, o la combinación BAP/ANA.
4. Considerando las variables oxidación, porcentaje de inducción y número de brotes obtenidos, la combinación BAP/ANA es la que presenta los mejores resultados.

Los datos generados en este estudio son de gran relevancia para poder establecer un protocolo de micropropagación que genere las mejores tasas de multiplicación en ambas orquídeas. Sin embargo, es necesario un estudio multidisciplinario que ahonde en estos datos y genere mejores resultados con miras a una producción masiva.

6. RECOMENDACIONES

Se requiere incrementar el stock de plantas madre del género *Phalaenopsis* del Laboratorio de Biotecnología Vegetal teniendo varios individuos del mismo cultivar para obtener suficientes explantes y evaluar varios tratamientos simultáneamente.

En ambos estudios de los dos géneros de orquídeas trabajadas resalta la gran influencia en la morfogénesis que tiene la calidad de los explantes, y es que mientras más joven sea el tejido, la micropropagación tendrá una mayor posibilidad de resultar exitosa, por ello es ampliamente recomendable dedicar un gran empeño en conseguir un buen material vegetal que actúe como donador de explante. Es importante recordar al momento de seleccionar el material vegetal que el balance hormonal está asociado al estado de desarrollo.

Con base en la experiencia desarrollada en la realización de esta tesis se recomienda realizar un establecimiento aséptico de al menos dos semanas, previo al establecimiento de los explantes en tratamientos con reguladores, para esto pueden emplearse agentes antioxidantes como el ácido cítrico, ácido ascórbico, u otros agentes como el carbón activado para controlar el proceso de oxidación.

Por otro lado, puede evaluarse la actividad de la PPO bajo diferentes tratamientos antioxidantes, sabiendo que existe una gran variabilidad en la oxidación de yemas de las cuatro variedades de *Phalaenopsis* utilizadas en este estudio.

La calidad de las plantas donadoras es un factor crítico que subsecuentemente afectará el rendimiento del cultivo *in vitro*, por lo que, es recomendable estandarizar las condiciones de crecimiento previas al establecimiento aséptico, tanto como sea posible para asegurar la calidad de los explantes, los principales aspectos que se deben considerar son luz, temperatura, riego, fertilización y humedad, además de hacer constantes revisiones para eliminar plagas o enfermedades. Manteniendo estas condiciones de manera favorable podrán observarse que las plantas madre se encuentran vigorosas y saludables.

Las combinaciones de reguladores de crecimiento en el estudio de ambas orquídeas pueden ser ampliadas para buscar una mayor regeneración.

Hay que mantener en mente al momento de emplear la micropropagación que la regulación hormonal dependerá no solo del genotipo propio de la especie elegida, sino también de los estímulos físicos del ambiente, por lo que la respuesta se verá afectada por la concentración y la proporción de cada hormona empleada.

Sabiendo de antemano el potencial económico que la orquídea *Cattleya* puede generar, y teniendo la posibilidad de trabajar con especies nativas de nuestro país, México puede entrar al comercio internacional desarrollando protocolos de micropropagación que satisfagan las necesidades del mercado, por lo que se espera que estos resultados contribuyan al mejoramiento económico del país y a su posicionamiento en un futuro como exportador reconocido.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Amiot, M.; Forget, F.; Goupy, P. 1996. Polyphenol, oxidation and color: progress in the chemistry of enzymatic and non-enzymatic derived products. *Herba-Polonica* 42:237-247.
- Arditti, J. 2008. *Micropropagation of Orchids*, volume I. 2nd edition. Blackwell Publishing. USA. Pp 300-327.
- Ávila, I. y R. Salgado. 2006. Propagación y mantenimiento in vitro de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Biológicas* No.8: 138-149.
- Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación en explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana* 20(1):153-175.
- Barba, A., S. Luna y J. Romero. 2002. *Orquideología Básica*. Universidad Autónoma de México. 1ª edición. México. Pp. 23.
- Barón, F. y F. Téllez. 2007. Independencia de variables categóricas. En: *Apuntes de Bioestadística*. Disponible en: <https://www.bioestadistica.uma.es/baron/apuntes/> Consultado Julio 2017.
- Bateman, J. 1895. *The Orchidaceae of Mexico & Guatemala*. *Curtis's Botanical Magazine Dedications*. 130pp.

- Bhojwani, S. and M. Razdan. 1983. Plant tissue culture: theory and practice. In: Development in crop science V. 5. Elsevier Sci., Publ., Co. New York, USA. Pp. 1-10.
- Blume, C. L. 1825. Contribuciones a la flora de las Indias Holandasas. Batavia. Pág. 294.
- Brandelli, A. and C. Lopes. 2005. Polyphenoloxidase activity browning potential and phenolic content of peaches during postharvest ripening. Journal of Food Biochemistry 29:624-637.
- Bulpitt, C., Y. Li, P. Bulpitt, y J. Wang. 2007. The use of orchids in chinese medicine. Journal of The Royal Society of Medicine 100(12):558-563. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2121637/#_ffn_sectitle (Consultado: Noviembre 2014).
- Cadevall, M. 2009. Darwin naturalista: el caso de la fecundación de las orquídeas. Teorema 28(2)95-105.
- Calva, G. y J. Pérez. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. Revista Digital Universitaria 6(11).
- Cameron, K. 2011. Vanilla orchids, natural history and cultivaton. Timber Press. China. Págs. 23-24.
- Campbell, D. 2013. Orchidaceae, brief summary. Encyclopedia of life. Disponible en: http://eol.org/data_objects/26748166 (Consultado Octubre 2014).
- Castle, L. 1886. Orchids their structure, history and culture. Applewood Books. E.U.
- Chang, C., W. C. Chang. 1998. Plant regeneration from callus culture of *Cymbidium ensifolium* var. *misericors*. Plant Cell Reports 17:251-255.

- Chang, Yeun-Kyung; R. E. Veilleux. 2009. Analysis of genetic variability among *Phalaenopsis* species and hybrids using amplified fragment length polymorphism. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 134(1):58-66.
- Chen J. and Chang W. 2001. Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* `Grower Ramsey`. *Plant Growth Regul.* 34:229-232.
- Chenglie, L. 2006. *La historia de Confucio*. Editorial Lectorum. 1ª edición. México. Pág. 157.
- Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. 2013. Base de datos sobre el comercio CITES. Programa de las naciones unidas para el medio ambiente, centro de monitoreo de la conservación mundial. 22 pp. Disponible en: http://trade.cites.org/es/cites_trade/ (Consultado Septiembre 2014).
- Coronado, A., y Soto E. 2004. *Guía de las Orquídeas de la Provincia de Cuenca*. 1ª edición. Diputación Provincial de Cuenca. España. 240 p.
- Cox T., L.D. 2013. Orquídeas: importancia y uso en México. *Bioagrobiencias* 6(2):4-7.
- Cueva, A., L. Concia y R. Cella. 2012. Molecular characterization of a *Cyrtorchilum loxense* somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK) gene expressed during somatic embryogenesis. DOI 10.1007/s00299-012-1236-x Disponible en:
https://www.researchgate.net/profile/Augusta_Cueva/publication/221847684_Molecular_characterization_of_a_Cyrtorchilum_loxense_Somatic_Embryogenesis_Receptor-

[like_Kinase_SERK_gene_expressed_during_somatic_embryogenesis/links/57d1f94d08ae0c0081e0592b.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3000000/links/57d1f94d08ae0c0081e0592b.pdf) (Consultado Septiembre 2015).

Cumo, C. 2013. Encyclopedia of cultivated plants: from *Acacia* to *Zinnia*. Volume I. ABC-CLIO. U.S.A. 729-733 pp.

Darwin, C. 2008. La Fecundación de las Orquídeas. Editorial Laetoli. España.

Darwin, C. 1876. The effects of cross and self fertilisation in the vegetable kingdom. Editor John Murray. Reino Unido.

Dioscorides, P. 1555. Dioscorides ilustrado por Laguna, acerca de la materia medicinal y de los venenos mortíferos. En Anvers, en casa de Iuan Latio. España. Págs. 353-355.

Donoghue, M., J. Doyle, and P. Cantino. 2007. Mesangiospermae. In: Towards a phylogenetic nomenclature of tracheophyta. P. Cantino, J. Doyle, S. Graham, W. Judd, R. Olmstead, D. Soltis, P. Soltis and M. Donoghue (eds.). Taxon 56 (3):822-846.

EOL. Encyclopedia of life. Available from: http://eol.org/pages/8156/hierarchy_entries/53046358/names (Consultado Noviembre 2014).

Espinosa F., A., J. M. Mejía M., M. T. Colinas L., M. A. Rodríguez E., A. E. Urbańczyk P., y M. A. Beltrán B. 2009. Catálogo nacional de especies y variedades comerciales de plantas y flores producidas en México. 1ª edición y Universidad Autónoma Chapingo. México. 350 p.

Feria, M., Chávez, M. y Quiala, E. 2007. Establecimiento *in vitro* de *Phalaenopsis*. Biotecnología Vegetal 7(1):27-33.

- Fernández, J., A. Diamante, M. McCarthy. 2013. Rol de la REDBIO/FAO en el desarrollo de la biotecnología agrícola en América Latina y el Caribe En: González A., M.T., y F. Engelmann (eds.). Crioconservación de Plantas en América Latina y el Caribe. Costa Rica. Págs. 1-14.
- Fiatt, R. 2000. La nutrición en las orquídeas. Biorganic.
- Flores, G., Legaria, J., Gil, I. Y Colinas, M. 2008. Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. Una orquídea amenazada y endémica de México. Revista Chapingo Serie Horticultura 14(3):347-353.
- Freuler, M. 2003. 100 Orquídeas argentinas. Editorial Albatros. Argentina. Pág. 7-17
- Gamborg, O., R. Miller and K. Ojima .1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Expt Cell Res. 50:151-158.
- GBIF. 2014. Global Biodiversity Information Facility. Disponible en: <http://www.gbif.org/species/>.
- George, E. 1996. Plant Propagation by Tissue Culture; part 2, En Practice. 2 ed. Exegetics Limited. Inglaterra. Pág. 574.
- González, M., N. Mogollón, G. Alvarado, A. Giménez y T. Capote. 2012. Efecto del medio de cultivo *in vitro* y la fuente nitrogenada sobre el crecimiento del cocuy (*Agave cocui* Trelease). Bioagro 24(1):39-44.
- Gottschalk, A. 2012. Las orquídeas y su cultivo. Available from: <http://www.paisajismotropical.com> (Consultado Octubre 2014).
- Gow, W-P, J-T Chen, W-C Chang. 2008a. Influence of growth regulators on direct embryo formation from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. Acta Physiol Plant. 30:507-512.

- Gow, W-P, J-T Chen, W-C Chang. 2008b. Effects of genotype, light regime, explant position and orientation on direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. *Acta Physiol Plant*.
- He, Y., X. Guo, R. Lu, B. Niu, V. Pasapula, P. Hou, F. Cai, Y. Xu and F. Chen. 2009. Changes in morphology and biochemical indices in browning callus derived from *Jatropha curcas* hypocotyls. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult*. 98:11-17.
- Hiche M., A, V. Goykovic y R. Chávez. 2004. Evaluación de respuestas fenotípicas de dos genotipos de orquídeas *Phalaenopsis* a diferentes niveles de salinidad en el agua de riego. *IDESIA. Chile*. 22(2):69-77.
- Hirtz, A. 2004. Historia de las orquídeas. Ecuador Terra Incognita. No. 31. Ecuador. Disponible en: http://www.terraecuador.net/revista_31/31_historia_orquideas.htm (Consultado Septiembre 2014).
- Ibarra, A., M. de C. Ojeda, E. García, A. Gutierrez. 2016. Inducción *in vitro* de brotes de dos cultivares de aguacate raza Mexicana *Persea americana* var. *drymifolia* Schlttdl.& Cham. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(2):337-347.
- InfoAserca. 2002. La vainilla en México, una tradición con un alto potencial. *Revista de Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria*. Disponible en: <http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/revistas/101/ca101.pdf> (Consultado Septiembre 2014).
- ITIS. Integrated Taxonomic Information System. 2014. System on-line database. Available from: <http://WWW.itis.gov> (Consultado: Octubre 2014).
- Inteligencia Comercial e Inversiones. 2013. Análisis sectorial de flores. Instituto de promoción de exportaciones e inversiones. Ecuador. Disponible en:

http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/07/PROEC_AS2013_FLORES.pdf (Consultado: Octubre 2014).

Izquierdo, J. y Y. López. 1991. Análisis e interpretación estadística de la experimentación *in vitro*. En: *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: fundamentos y aplicaciones*. W. Roca y L. Mroginski (eds.). Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia. Págs. 375-399.

Jarava, J. 2005. *Historia de las Yervas y Plantas*. Ediciones Universidad de Salamanca. 1ª edición. España. Págs. 269-271.

Jiménez, M., E. Guevara. 1996. Propagación *in vitro* de *Phalaenopsis* (Orchidaceae) mediante el cultivo de secciones de ejes florales después de la senescencia de las flores. *Agronomía Costarricense* 20(1):75-79.

Judd, W.S., C.S. Campbell, E.A. Kellogg, P.F. Stevens, and M.J. Donoghue. 2008. *Plant Systematics, a Phylogenetic Approach*. 3th ed. Sinauer associates, Inc. China. Pp. 273-275.

Knudson, L. 1946. A nutrient for germination of orchid seeds. *American Orchid Society Bulletin* 15:214-217.

Krikorian, A. 1991. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. W. Roca y L. Mroginski (eds.). Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia. Págs. 48.

Krikorian, A. and D. Berquam. 1969. Plant cell and tissue culture: the role of Haberlandt. *Bot. Rev.* 35(1):59-88.

- Košir, P., S. Škof and Z. Luthar. 2004. Direct shoot regeneration from nodes of *Phalaenopsis* orchids. *Acta agriculturae slovenica* 83(2):233-242.
- Kulikov, P., and E. Filippov. 2001. Specific features of mycorrhizal symbiosis formation in the ontogeny of orchids of the temperate zone. *Russian Journal of Ecology* 32(6):408-412.
- Lugo C., A. 2012. Recolección, cultivo y comercio de la vainilla en Veracruz durante el siglo XIX. *Boletín Científico del Instituto de Ciencias Sociales y Humanidades* Vol. 1 No. 1. Disponible en: <http://www.uaeh.edu.mx/scige/boletin/icshu/n1/e1.html> (Consultado Octubre 2014).
- Mathur, J. 1993. Somatic embryogenesis from callus culture of *Nardostachys jatamansi*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 163-169.
- Meijomin, A., A. Vieitez Y C. Sánchez. 2010. Caracterización de genes relacionados con el desarrollo de embriones somáticos en roble. X Reunión de biología molecular de plantas. España.
- Menchaca, R. 2011. Manual para la Propagación de Orquídeas. Comisión Nacional Forestal. 1ª edición. México. 51 p.
- Menchaca, R., M. Lozano y L. Sánchez. 2012. Estrategias para el aprovechamiento sustentable de las orquídeas de México. *Rev. Mex. de Cienc. Forestales* 3(13):9-16.
- Merino, M. 2014a. Técnicas de esterilización y manipulaciones asépticas. En: *Cultivo de tejidos vegetales*. Reimpresión de la 1a edición. Editorial Trillas México. Págs 44-46.

- Merino, M. 2014b. Medio de cultivo. En: Cultivo de tejidos vegetales. Reimpresión de la 1a edición. Editorial Trillas. México. Págs. 67-79.
- México. SAGARPA. Comité Estatal Sistema Producto Vainilla de Puebla, A.C. 2010. Estudio de oportunidades de mercado internacional para la vainilla mexicana. Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. Fideicomiso de riesgo compartido. México. Pág. 11 Disponible en: http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/VAINILLA.pdf (Consultado Septiembre 2014).
- Moreira-Muñoz, A. 2010. Darwin alrededor de las orquídeas. Argumento Revista universitaria. Chile. No. 104:17-23.
- Mroginski, L., P. Sansberro y E. Flaschland. 2010. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. 2ª edición. Levitus, G., V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski editores. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. Págs. 17-33.
- Murguía G., J. 2007. Curso de capacitación, producción de orquídea, anturio, gardenia y ave del paraíso. Universidad Veracruzana y Fundación Produce Veracruz. México. Págs. 1-25.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15:473-497.
- MNH. Museum of Natural History. 2011. Orchids, a view from the east. In: National museum of natural history Smithsonian gardens exhibition. Available from: <http://www.mnh.si.edu/exhibits/orchids/> (Consultado Octubre 2014).
- Nayak, N., Susmita S., Satyanarayan P., Shiba P. 2002. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium*

- aloifolium (L.) Sw. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). *Scientia Horticulture* 94:107-116.
- 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.
- Park, S. and K. Paek. 2000. Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. *Plant Cell, Tissue and Organ culture* 63:67-72.
- Park, So-Young, H. Murthy and K. Paek. 2002. Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 38:168-172.
- Pequeño, I., G. Martínez, V. Aguirre, L. Iracheta, V. Mojica, G. Rodríguez y M. Ojeda. 2015. Efecto del NaClO sobre la actividad de la polifenol oxidasa en explantes de hoja y peciolo de dos genotipos de *Jatropha curcas* L. *Bioagro* 27(3):167-172.
- Pinaki, M. Firoz and M. Lokman. 2010. Micropropagation of *Phalaenopsis* Blume. In: *Protocols for in vitro Propagation of Ornamental Plants*. Edit. Mohan, S. And S. Ochatt. Humana Press. E.U. Pp. 77-85.
- Preece, J. 2008. Stock plant physiological factors affecting growth and morphogenesis. George, E., M. Hall and G. De Klerk (eds.). In: *Plant Propagation by Tissue Culture Volume I*. 3th Edition. Springer. Países Bajos. 403-422 pp.

- Radice, S. 2010. Morfogénesis. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. 2ª edición. Levitus, G., V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski (eds.). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. Págs. 26-33.
- Ramírez, S. 1999. Cultivo in vitro de la orquídea *Laelia anceps* Lindl, subespecie *dawsonii* f. *chilapensis*. Memorias VIII. Congreso de Horticultura. México. Pág. 63.
- Raven, P., R. Evert y S. Eichhorn. 1992. Biología de las Plantas. 4ª edición. Editorial Reverté. España. Págs.481-490.
- Rojas, S., J. García y M. Alarcón. 2009. Propagación asexual de plantas, conceptos básicos y experiencias con especies amazónicas. Corporación colombiana de investigación agropecuaria. Colombia. Págs 10-36.
- Salazar, S., Amaya, A. y Barrientos, F. 2013. Evaluación de diferentes medios de cultivo in vitro en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). Revista Colombiana de Biotecnología 15(2):97-105.
- Salgado, R., R. López, M. Martínez, y A. García. 2007. Biotecnología de plantas. Ciencia Nicolaita 48:65-78.
- Scalzo, J., A. Politi, N. Pellegrini, B. Mezzetti and M. Battino. 2005. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. Nutrition 21:207-213.
- Schaeffer, W. 1990. Terminology *in vitro*. Terminology associated with cell, tissue and organ culture, molecular biology and molecular genetics. *In vitro* cell. Dev. Biol. 26:97-101.
- Schooser, G. 1993. Orchid Growing Basics. Sterling Publishing Co. E.U.

- Shapiro, L. 2011. *Cattleya* orchids, comprehensive description. Encyclopedia of Life. Disponible en: <http://eol.org/pages/29122/details> (Consultado octubre 2014).
- Sheehan, T.J. 2004. Orquídeas. En: Larson R., A. Editor. Introducción a la Floricultura. 1ª edición. A.G.T. Editor. México. Págs. 119-146.
- Shenk, R. and Hildebrandt. 1972. Médium and techniques for induction and growth of monocotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-204.
- SIAP. Sistema de información Agroalimentaria y Pesquera. 2008. Resumen Nacional por cultivo. <http://www.gob.mx/siap/>.
- SINAREFI. Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura. Red Orquídeas. Disponible en: http://www.sinarefi.org.mx/redes/red_orquideas.html (Consultado Octubre 2015).
- Skoog, F. and C. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11:118–131.
- Skoog, F. and C. Tsui. 1948. Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured *in vitro*. *Am. J. Bot.* 35 782–787.
- Smith, R.H. 2009. *Plant Tissue Culture, Techniques and Experiments*. 2nd edition. Academic Presss. USA. Pp. 44-74.
- Stevens, P. F. 2001. Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July 2012. Disponible en: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> Consultado diciembre 2014.
- Steward, F., M. Mapes, A. Kent, and R. Holsten. 1964. Growth and development of cultured plant cells. *Science* 143: 20–27.

- Street, H. 1977. Cell (suspension) cultures techniques. In: Street, H. Ed. Plant Tissue and Cell Culture. Blackwell Scientific Publishing, Oxford, England. Pp. 61-102.
- Taiz, L., E. Zeiger. 2006. Plant Physiology. 4th edition. Sinauer Associates, Inc. USA. 410-412 pp.
- Tirado, J., Naranjo, E. y Athortúa, L. 2005. Propagación in vitro de *Phalaenopsis* (orchidaceae) a partir de protocormos, mediante el sistema de inmersión temporal "RITA". Revista Colombiana de Biotecnología 6(1):25-31.
- Tiza, A.G. 2010. Propagación *in vitro* de las orquídeas *Dendrobium*, *Laelia anceps*, *Phalaenopsis* y *Sobralia xantholeuca*. Tesis. Universidad Veracruzana. México. Págs. 15-59.
- Torres, J. y N. Mogollón. 2000. Micropropagación de *Cattleya mossiae* Parker ex Hook mediante brotación axilar inducida por tidiazurón. Bioagro 12(1):10-14.
- Trelka, T., W. Brés, A. Józwiak and A. Kozłowska. 2010. *Phalaenopsis* cultivation in different media. Part ii. Nutrients and chlorophyll concentration in leaves and roots. Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus 9(3):95-104.
- Van Staden, J.; Fenell, C.; Taylor, N. 2006. Plant stress in vitro: the role of phytohormones. Acta Horticulturae 725: 55-62.
- Victoriano, H. 2010. Organogénesis *in vitro* de arándano *Vaccinium corymbosum* L. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. México. Págs. 23-34.
- Villalobos, V., T. Thorpe. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. W. Roca y L. Mroginski (eds.). Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia. Págs. 131-138.

White, P. 1963. *The Cultivation of Animal and Plant Cells*. 2nd ed. Ronald Press. E.U.
pp. 30-44.