



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Propagación *in vitro* de *Laelia albida*, orquídea
endémica de México.**

**T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:
MARIANA IVONNE ESCOBEDO NAVA**

TUTOR: Dr. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA
Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales,
Jardín Botánico, Instituto de Biología-UNAM

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO-2019





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatorias.

Con mucho amor y cariño.

A mi hijo Pael,

A mis padres Ricardo Escobedo y Paula Nava.

A mis hermanas Mónica, Angélica, Martha Lety y Nallely.

A mis sobrinos Bryan, Fahir, Tania, Adnel e Iker.

A Oscar Pael.

Solo con el corazón se puede ver bien.

Lo esencial es invisible a los ojos.

(El principito).

Agradecimientos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi casa de estudios y abrirme las puertas de sus instalaciones, en el Colegio de Ciencias y Humanidades Azcapotzalco y en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, siempre es un orgullo ser parte de esta comunidad estudiantil donde conocí a mis mejores amigos, y a cada uno de los profesores de los cuales aprendí como profesionista y como persona.

Al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología UNAM y a todo su personal, especialmente a mi amigo y tutor el Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila por darme la oportunidad de realizar el proyecto de tesis, por su apoyo incondicional, el tiempo que me brindó, sus conocimientos, su comprensión y por alimentar siempre a sus estudiantes con pizza.

A la M. en C. Wendy Roció Juárez Pérez quien me apoyo de manera amable y paciente en los experimentos de la presente tesis, muchas gracias maestra.

Al M. en C. Octavio González Caballero por su apoyo siempre incondicional, agradezco cada uno de los conocimientos y las observaciones muy valiosas que me brindó.

A la Ing. Raquel Cid por el material biológico que donó, las cápsulas de *L. albida*, sin estas semillas este trabajo no habría sido posible.

A cada uno de los integrantes del comité del jurado, el Dr. Juan Gerardo Ortiz Montiel, el M. en C. Alfonso Reyes Olivera, al Biólogo Marcial García Pineda y la Bióloga Yolanda Pozos Ruiz, por sus observaciones, conocimientos y el apoyo que me brindaron.

A mis amigos de la FESI con quien viví largos días de prácticas de campo, en clases y como olvidar los viernes social: Daniela, Iza, Karencita, Jocelyne, Julia, Román, Ale, Lulú, médico y Josafat, a mis amigos del Parque Bicentenario SEMARNAT donde convivimos 480 hrs. y nunca fueron suficientes para andar en bicicleta, en los biomas, inventariando y en la hora del café: Fanny, Arturo, Angélica, Diana, Ricardo y Zule, y a mis amigos y compañeros del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales gracias por esos largos días en el laboratorio, en las campanas subcultivado y haciendo ciencia, en los eventos como los días de los jardines botánicos, gracias por el apoyo que siempre recibí y su amistad: Jorge, Montse, Alan, Jair, Lety, Laura, Sara, Alo, Daniela y Silvana.

Abreviaturas.

AIA: Ácido indol-3-acético.

ABA: Ácido abscísico.

AIB: Ácido indol-3-butírico.

ANA: Ácido α -naftalenacético.

BA: N⁶-benciladenina.

CA: Carbón activado.

CTV: Cultivo de tejidos vegetales.

KC: Medio de cultivo Knudson C (1946).

KIN: Kinetina.

MS: Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962).

MS50/100: MS con 50 % de sales inorgánicas y 100 % de compuestos orgánicos.

MS50: MS al 50 % de todos sus componentes.

NaClO: Hipoclorito de sodio.

RCV: Reguladores de crecimiento vegetal.

TDZ: Tidiazurón.

TTZ: Cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolio.

PLBs: Cuerpos parecidos a protocormos.

Índice.

Índice de tablas.....	1
Índice de figuras.....	2
1. Introducción.	5
2. Antecedentes.....	8
2.1 Biodiversidad en México.....	8
2.2 Generalidades de la familia Orchidaceae.	10
2.2.1 Distribución y hábitos de crecimiento.	11
2.2.2 Usos de la familia Orchidaceae.....	11
2.3 Las orquídeas en México.....	14
2.3.1 Distribución de Orquídeas en México.....	14
2.4 El género <i>Laelia</i> en México.	14
2.4.1 Características del género <i>Laelia</i>	14
2.4.2 Descripción.	15
2.4.3 Ecología y distribución.	18
2.5 <i>Laelia albida</i> Batem ex Lindl.	19
2.5.1 Descripción.	20
2.5.2 Hábitat.	21
2.5.3 Distribución.	23
2.6 Problemática de las orquídeas.	24
2.7 Alternativas de conservación.....	25
2.7.1 Conservación <i>in situ</i>	25
2.7.2 Conservación <i>ex situ</i>	28
2.8 Cultivo de Tejidos Vegetales.	31
2.8.1 Micropropagación.	31
2.8.2 Vías de regeneración <i>in vitro</i>	33
2.8.3 Factores que influyen en la micropropagación.	35

2.8.4 Reguladores de crecimiento vegetal (RCV).....	37
2.8.5 Usos y aplicaciones del CTV.....	40
2.8.6 El CTV en la familia Orchidaceae.....	42
2.8.7 El CTV en el género <i>Laelia</i>	44
3. Justificación.	49
4. Objetivos.....	50
4.1 Objetivo general.	50
4.2 Objetivos particulares.	50
5. Materiales y métodos.	51
5.1 Selección del material biológico.....	51
5.2 Propagación <i>in vitro</i> de <i>L. albida</i> por semillas.....	51
5.2.1 Establecimiento de características y método de almacenamiento de las semillas.....	51
5.2.2 Detección de viabilidad de semillas.....	51
5.2.3 Establecimiento aséptico y siembra <i>in vitro</i> de semillas.	52
5.2.4 Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>L. albida</i>	52
5.2.5 Desarrollo y multiplicación de plántulas obtenidas de la germinación <i>in vitro</i>	53
5.2.6 Respuestas morfogénicas de cultivos de tallos y raíces.....	53
5.2.7 Establecimiento <i>ex vitro</i>	54
6. Resultados y discusión.	57
6.1 Propagación <i>in vitro</i> de <i>L. albida</i> por semillas maduras.	57
6.1.1 Características de semillas.	57
6.1.2 Viabilidad de semillas.....	58
6.1.3 Establecimiento aséptico de semillas.....	61
6.2 Germinación y desarrollo de semillas de <i>L. albida</i>	61
6.2.1 Descripción de la germinación y desarrollo de <i>L. albida</i>	62
6.3 Multiplicación y desarrollo de plántulas de <i>L. albida</i> provenientes de germinación <i>in vitro</i> de semillas maduras.	66
6.4 Respuestas morfogénicas de cultivos de tallos.....	67

6.5 Respuestas morfogénicas de cultivos de raíces.	72
6.6 Establecimiento <i>ex vitro</i>	75
6.6.1 Establecimiento <i>ex vitro</i> de plántulas germinadas y desarrolladas <i>in vitro</i>	75
6.6.2 Establecimiento <i>ex vitro</i> de plántulas regeneradas en cultivos de tallos.....	78
7. Conclusiones.	80
8. Bibliografía.....	81
9. Apéndice 1.....	90
10. Apéndice 2.....	91

Índice de tablas.

Tabla 1 Uso de diferentes especies de la Familia Orchidaceae.	13
Tabla 2 Categorías de las áreas naturales protegidas federales en México (CONANP, 2018).....	27
Tabla 3 Métodos <i>ex situ</i> de conservación de plantas.	28
Tabla 4 Ejemplos de diferentes auxinas naturales y sintéticas en el CTV.	38
Tabla 5 Ejemplos de diferentes citocininas naturales y sintéticas utilizadas en el CTV.	39
Tabla 6 Ejemplos de otros RCV y sustancias afines utilizadas en el CTV.	40
Tabla 7 Propagación por medio del CTV en diferentes especies vegetales.	41
Tabla 8 El CTV en diferentes especies de la familia Orchidaceae.	43
Tabla 9 Micropropagación de diferentes especies del género <i>Laelia</i>	45
Tabla 10 Etapas o estadios del desarrollo de la germinación de orquídea propuesta por Arditti (1966), Harrison y Arditti (1978).	53
Tabla 11 Tratamientos utilizados para inducir respuestas morfogénicas con auxina (ANA) y citocinina (TDZ) a partir de segmentos de tallo y raíz de plántulas de <i>L. albida</i> provenientes de germinación <i>in vitro</i>	54
Tabla 12 Mezclas de sustratos para la aclimatización de plantas de <i>L. albida</i> provenientes de la germinación <i>in vitro</i>	55
Tabla 13 Lotes 1 y 2 de semillas de <i>L. albida</i> y porcentajes de semillas con embrión y semillas vacías.	58
Tabla 14 Porcentajes de contaminación en cultivos de semillas sembradas <i>in vitro</i> de <i>L. albida</i> en medio MS50/100 y KC. Resultados después de 30 días de iniciados los cultivos.	61
Tabla 15 Porcentaje de germinación de semillas maduras de <i>L. albida</i> de los lotes 1 y 2 en medios de cultivo MS50/100 y KC. Resultados después de 100 días de iniciados los cultivos.	61
Tabla 16 Descripción de la germinación y el desarrollo <i>in vitro</i> de <i>L. albida</i> en medios de cultivo MS50/100 y KC.	62
Tabla 17 Promedio de longitud de plantas de <i>L. albida</i> después de 100 días de siembra <i>in vitro</i> de semillas.	63
Tabla 18 Multiplicación de plantas de <i>L. albida</i> provenientes de germinación <i>in vitro</i> , multiplicadas en medio MS50/100 + BA (0.1 mg/L) durante 30 días de inducción y 250 días de multiplicación en medio MS50/100 sin RCV.	66
Tabla 19 Resultados de morfogénesis en cultivos de tallos de <i>L. albida</i> después de ser inducidos con un barrido hormonal de ANA/TDZ (70 días), y subcultivados en medio MS50/100 sin RCV (200 días).	67

Tabla 20 Resultados de morfogénesis en cultivos de raíz de <i>L. albida</i> después de ser inducidos con un barrido hormonal de ANA/TDZ (70 días) y subcultivados en medio MS50/100 sin RCV (200 días).	72
Tabla 21 Porcentajes de supervivencia de la aclimatización de plantas de <i>L. albida</i> provenientes de semillas germinadas y multiplicadas <i>in vitro</i> en 3 diferentes mezclas de sustratos (tratamientos), después de 100 días de ser establecidas <i>ex vitro</i>	76
Tabla 22 Composición del medio de cultivo MS50/100.	90
Tabla 23 Composición del medio de cultivo Knudson C.	91

Índice de figuras.

Fig. 1 Morfología del género <i>Laelia</i>	17
Fig. 2 Distribución del Género <i>Laelia</i> en México.	18
Fig. 3 Flor de <i>Laelia albida</i>	19
Fig. 4 <i>L. albida</i> creciendo sobre un árbol de Mezquite.	21
Fig. 5 Morfología de <i>L. albida</i>	22
Fig. 6 Distribución de <i>L. albida</i>	23
Fig. 7 Propagación <i>in vitro</i> de <i>L. albida</i> por semillas maduras.	56
Fig. 8 Semillas de <i>L. albida</i>	57
Fig. 9 Semillas de <i>L. albida</i> después de 24 horas embebidas en TTZ.	58
Fig. 10 Respuestas morfogénicas en cultivos de tallo de <i>L. albida</i> . Después de 70 días de inducción y 200 días en medio MS50/100 sin RCV.	69
Fig. 11 Respuestas morfogénicas de cultivos de raíz. Después de 70 días en inducción y 200 días en medio MS50/100 sin RCV.	74
Fig. 12 Aclimatización de <i>L. albida</i>	77
Fig. 13 Plántulas aclimatizadas, 100 días, provenientes del cultivos de tallo.	78

Resumen.

Laelia albida Batem ex Lind, es una especie endémica de México cuenta con poblaciones en la Sierra madre Occidental y la Sierra Madre del Sur, pero está severamente amenazada por alteración de su hábitat, colecta ilegal y efectos del cambio climático. Sus flores han sido utilizadas durante siglos como ofrendas en festividades del “Día de muertos”. Esta acción interfiere en su reproducción, además de su largo y lento ciclo de vida, presenta ciertas dificultades para su propagación de forma natural que provocan el escaso reclutamiento de nuevos individuos. A pesar de la importancia biológica, ecológica, cultural, ornamental y comercial, su propagación es limitada por lo que es necesario buscar alternativas. El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) ha demostrado ser una útil herramienta biotecnológica para la propagación, conservación y aprovechamiento sustentable de numerosas especies de orquídeas (*Vanilla*, *Cattleya*, *Dendrobium*, entre otras), ya que diferentes secciones de la planta pueden ser fuente de regenerantes.

El presente estudio exploró condiciones de cultivo *in vitro* bajo las cuales es posible controlar y dirigir el desarrollo de las células de distintos explantes y con ello establecer bases para la propagación de *L. albida*. Utilizando diferentes medios de cultivo (MS y KC) y diferentes concentraciones de Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV). A partir de semillas maduras obtenidas de polinización natural en su hábitat, se logró el establecimiento aséptico *in vitro*, con la aplicación de distintos tratamientos de soluciones de NaClO al 10 y 5 % V/V. Las semillas fueron sembradas en los medios de cultivo MS y KC. Plántulas obtenidas de esta germinación asimbiótica, fueron cultivadas en medio MS con N6-benciladenina (BA) para su desarrollo y multiplicación *in vitro*, obteniendo un promedio de 5 y 6 brotes por plántula. Un lote con 90 de estas plántulas de 3 cm fueron aclimatizadas en invernadero, en 3 tratamientos de mezclas de sustratos diferentes (corteza, tepojal y agrolita (1:1:1); corteza y tepojal (2:1); corteza y agrolita (2:1)), a una temperatura de 25 ± 2 °C y después de 100 días de aclimatización se obtuvieron porcentajes de supervivencia del 75, 85 y 90. Por otra parte un lote con 120 de plántulas germinadas y desarrolladas *in vitro* de 1 a 2 cm, fueron disectadas en tallo y raíz, estos explantes se cultivaron en medio MS con distintas concentraciones en el intervalo de 0–1 mg/L de dos RCV: Ácido α -naftalenacético (ANA) con Tidiazurón (TDZ) durante 70 días. Posteriormente se subcultivaron cada 60 días en medio MS 50/100 sin RCV durante 200 días con una incubación de 25 ± 2 °C en fotoperíodo de 16 horas. Como respuestas morfogenéticas en los cultivos de tallos se desarrollaron brotes vía organogénesis directa; y en los cultivos de raíz se obtuvo elongación de la raíz y el desarrollo de velamen. Plántulas provenientes de la organogénesis directa de tallos, que median de 3 a 5 cm fueron aclimatizadas en invernadero, en una mezcla de dos sustratos (corteza y agrolita (2:1)) a una temperatura de 25 ± 2 °C obteniendo 91.45 % de supervivencia después de 100 días de aclimatización. La presente investigación con Cultivo de

Tejidos determinó condiciones para la desinfección, germinación asimbiótica, crecimiento, multiplicación a partir de diferentes explantes y aclimatización de *L. albida*. Se ha contribuido con el establecimiento de bases para la propagación *in vitro*, la conservación *ex situ* y el uso sustentable de esta orquídea amenazada.

1. Introducción.

La biodiversidad es la variabilidad de la vida y es estudiada en cuatro niveles de organización biológica: la variabilidad genética de todos los organismos, la riqueza de especies, diferentes ecosistemas y las relaciones entre estos. De este modo en los niveles que se estudia la biodiversidad México es considerado un país “Megadiverso”, se estima que en el territorio mexicano habita entre el 10 y 12 % de las especies del mundo, esto es el resultado de la ubicación geográfica, su complejo relieve, sus climas y su historia evolutiva han conformado ecosistemas únicos a nivel mundial y una diversificación de muchos grupos taxonómicos (CONABIO, 2009; SEMARNAT, 2013; CONANP, 2016). México está entre los cinco países con mayor riqueza de flora después de Brasil (56 000 especies), Colombia (35 000 especies), China (27 100 especies) y Sudáfrica (23 420 especies), en México se registra 23 314 especies de plantas vasculares. La mayor diversidad se encuentra en los bosques templados, matorral xerófilo, bosque húmedo de montaña y bosque tropical, los cinco estados con mayor riqueza de especies son: Oaxaca, Chiapas, Veracruz, Jalisco y Guerrero. Se calcula que 11 001 son especies endémicas es decir que solo se encuentran en nuestro territorio, una de las familias que cuenta con mayor número de especies endémicas son las orquídeas (Villaseñor y Ortiz, 2014; Villaseñor, 2016).

Las orquídeas son plantas monocotiledóneas, herbáceas y perennes, pertenecen a la familia Orchidaceae, son plantas fascinantes que representan la cúspide de procesos evolutivos y ecológicos del reino vegetal, debido a que exhiben modificaciones en estructuras vegetativas y florales así como mecanismos de polinización altamente especializados y complejidad floral, han aprovechado los recursos que se encuentran a su alcance y ocupar gran variedad de nichos, es por ello que cuentan con una gran diversidad, las estimaciones sugieren entre 20 000 y 30 000 especies (Flores, 2011; Hágsater *et al.*, 2015).

Las orquídeas han sido conocidas, cultivadas y apreciadas por diferentes culturas desde tiempos muy antiguos al menos 25 siglos. En México en la época del Reinado Azteca utilizaban *Vanilla planifolia* como aromatizante y pago de tributos, desde la época del México precolombino se han utilizado géneros como *Laelia*, *Prosthechea*, y *Bletia*, para preparar un mucílago usado como pegamento para elaborar instrumentos y adornos como alfeñiques (Hágsater *et al.*, 2015). En la actualidad orquídeas del género *Arpophyllum*, *Epidendrum*, *Bletia*, *Catasetum*, *Cyrtopodium*, *Prosthechea*, *Laelia*, *Malaxis*, *Calanthe* y *Rhyncholaelia* en la medicina tradicional mexicana. El país alberga una notable riqueza de orquídeas, alrededor de 1260 especies y 170 géneros, de las cuales se estima que el 40 % son endémicas, uno de los géneros endémicos es *Laelia* (Hágsater *et al.*, 2015).

El género *Laelia* reporta 12 especies, entre ellas *Laelia albida* la cual ha sido apreciada y utilizada durante siglos como ofrenda en festividades de “Día de muertos”, de allí sus nombres comunes “calaverita”, “lirio de todos los santos”, “flor de muerto” y “flor de las ánimas”, (Halbinger y Soto, 1997; Salazar *et al.*, 2006). Sin embargo la colecta excesiva de sus flores para esta celebración las pone en alto riesgo de depredación, además uno de los factores de riesgo es su largo ciclo de vida, se ha reportado de 56 años o más en *L. speciosa*, la propagación vegetativa aplaza mucho tiempo y la fuerte presión por los recolectores va en aumento, en varios mercados de la ciudad de México se venden flores silvestres a precios muy bajos (Halbinger y Soto, 1997; Hágsater *et al.*, 2015).

Por otra parte el crecimiento poblacional global ocurrido durante el siglo XX, acompañado por el intenso desarrollo industrial y urbano, trajeron consigo la mayor transformación de los ecosistemas terrestres afectando la superficie remanente y la continuidad de la vegetación natural. De acuerdo con el Millenium Ecosystem Assessment (2005), para el año 2000, 42 % de los bosques mundiales habían sido transformados, así como 18 % de las zonas áridas y 17 % de los ecosistemas insulares, principalmente a zonas de cultivos, potreros y desarrollo de ciudades. México no ha sido la excepción en este proceso de degradación y pérdida de ecosistemas terrestres. Una importante proporción de su territorio se ha transformado en campos agrícolas, pastizales y zonas urbanas y de los ecosistemas que aún persisten muchos de ellos muestran en mayor o menor medida signos de alteraciones. Baste decir que también han sido la causa de la liberación a la atmósfera de una gran cantidad de gases de efecto invernadero, lo cual exacerba el problema del cambio climático, el mal uso, el abuso de recursos maderables afecta a las orquídeas siendo que estas se reproducen adheridas a las copas de los árboles, se sabe que en los últimos años a partir de 1998 se han extinguido al menos 22 especies de orquídeas entre ellas una del género *Laelia* (*L. gouldiana*) (SEMARNAT, 2013).

En los últimos años, en México la legislación y normatividad en cuestiones ambientales buscan proteger y detener la pérdida de la superficie remanente de ecosistemas naturales, además de salvaguardar a ecosistemas y especies representativas de la biodiversidad nacional. En la Norma Oficial Mexicana 059-SEMARNAT 2010, se enlistan en 90 géneros y 188 especies de orquídeas, de las cuales 75 son orquídeas endémicas y cuatro de éstas son especies del género *Laelia* (*L. anceps* *sb. dawsonii*, *L. gouldiana*, *L. speciosa* y *L. superbiens*) lo cual representa el 33.33 % del género *Laelia*, estas listas deberían ser actualizadas cada 3 años o antes según lo establecido en la NOM 059 SEMARNAT. Santos (2002) estudió la población de *L. albida* y propone su inclusión en categoría de amenazada (NOM 059 SEMARNAT, 2010; SEMARNAT, 2013). La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) ubica 880 especies de orquídeas mexicanas en la lista de especies en riesgo de extinción. La Convención sobre el Comercio Internacional de Especies

Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES), se encuentra la familia entera de Orchidaceae incluida en el apéndice II (UICN, 2017; Flores, 2011).

Sin embargo estas medidas no han sido suficientes para regular el tráfico de *Laelias* silvestres por lo que se requiere el uso de nuevas biotecnologías como lo es el Cultivo de Tejidos Vegetales la cual es una alternativa de conservación *ex situ* que aporta el conocimiento del desarrollo de la especie e investigación en el germoplasma, almacenamiento a largo plazo y evita la destrucción del material biológico por factores bióticos y abióticos. Además de una propagación rápida y masiva, que puede abastecer la demanda comercial sin poner en riesgo este recurso natural, esto daría oportunidad de reducir el saqueo de poblaciones silvestres y conservar *in situ* a *Laelia albida*, para que continúen sus procesos de adaptación, evolución en condiciones naturales y continuarían brindando servicios ecológicos (Villalobos y Thorpe, 1991).

Se han reportado trabajos de la propagación *in vitro* de diferentes especies del género *Laelia* tales como: *L. albida*, *L. anceps*, *L. anceps* sp. *Dawsonii*, *L.anceps* subsp. *anceps*, *L. autumnalis*, *L. eyermaniana*, *L. gouldiana*, *L. halbingeriana*, *L. rubescens*, *L. speciosa* y *L. superbiens*. En *L. albida* se han realizado pruebas de viabilidad de semillas con TTZ (Ortiz, 2001; Santos, 2002). La germinación asimbiótica se ha establecido a partir de semillas maduras y cápsulas cerradas en medio de cultivo MS (Ávila y Salgado, 2006). En la germinación asimbiótica con medio KC se ha utilizado con semillas maduras (Ortiz, 2002; Santos, 2002; Santos *et al.*, 2005).

2. Antecedentes

2.1 Biodiversidad en México.

La biodiversidad es la variedad de la vida. Este reciente concepto incluye varios niveles de la organización biológica: 1. La variabilidad genética de todos los organismos, 2. La riqueza de especies y 3. Los distintos ecosistemas donde habitan, y también se considera un 4: El resultado de las relaciones que existen entre estos mismos elementos y las sociedades tales como procesos ecológicos, evolutivos y culturales (Convenio sobre la diversidad biológica, 1992; Núñez *et al.*, 2003; CONABIO, 2009).

En cada uno de los niveles, desde genes hasta paisaje o región, podemos reconocer tres atributos: composición, estructura y función. La composición es la identidad y variedad de los elementos (incluye qué especies están presentes y cuántas hay), la estructura es la organización física o el patrón del sistema (incluye abundancia relativa de las especies, abundancia relativa de los ecosistemas, grado de conectividad, etc.) y la función son los procesos ecológicos y evolutivos incluye a la depredación, competencia, parasitismo, dispersión, polinización, simbiosis, ciclo de nutrientes, perturbaciones naturales, etc. (CONABIO, 2009).

México es considerado un país “megadiverso”, ya que forma parte del selecto grupo de Naciones poseedoras de la mayor riqueza de animales y plantas, casi el 70 % de la diversidad mundial de especies. La ubicación geográfica de México, su complejo relieve, sus climas y su historia evolutiva han resultado en la gran riqueza de ambientes que conforman ecosistemas únicos a nivel mundial, creando una variada gama de condiciones que hacen posible la coexistencia de especies de origen tropical y boreal, y que también han permitido, al paso del tiempo, una intensa diversificación de muchos grupos taxonómicos en las zonas continentales de su territorio y a lo largo de sus zonas costeras y oceánicas (Espinosa y Ocegueda, 2008; CONANP, 2016).

De este modo, en los tres niveles en los que se estudia la biodiversidad (ecosistemas, especies y genes), México posee una riqueza especialmente importante. En casi dos millones de kilómetros cuadrados que abarca el territorio mexicano (tan sólo 1.5 % de la superficie terrestre del Planeta) se estima que en México habita entre 10 y 12 % de las especies del mundo (SEMARNAT, 2013; Campos, 2015).

En lo que respecta a la flora nacional, México está entre los cinco países con mayor riqueza florística en el mundo, después de Brasil (56 000), Colombia (35 000), China (27100) y Sudáfrica (23 420). En plantas vasculares nativas de México se registran 23 314 especies, distribuidas en 2 854 géneros,

297 familias y 73 órdenes. La flora incluye 1 039 especies de helechos y licofitas, 149 gimnospermas y 22,126 angiospermas. La forma de crecimiento más frecuente es la herbácea, seguida por la arbustiva y la arbórea; en tanto que las epifitas, las trepadoras y las parásitas son menos frecuentes. La mayor diversidad se encuentra en los bosques templados, seguida por la de matorral xerófilo, bosque húmedo de montaña, bosque tropical estacionalmente seco y bosque tropical húmedo. Los 5 estados con mayor riqueza de especies son Oaxaca, Chiapas, Veracruz, Jalisco y Guerrero (Villaseñor y Ortiz, 2014; Villaseñor 2016).

Las especies que sólo se encuentran en nuestro territorio, es decir, las especies endémicas, también complementan de manera importante la riqueza biológica de México. Se calcula que 11 001 de ellas endémicas. Entre ellas, las orquídeas y cactáceas son algunas de las familias que cuentan con mayor número de especies endémicas (SEMARNAT, 2013; Villaseñor y Ortiz, 2014).

2.2 Generalidades de la familia Orchidaceae.

Las orquídeas son plantas monocotiledóneas, herbáceas y perennes, pertenecientes a la familia Orchidaceae que se caracterizan por una gran diversidad de flores, colores y aromas, además de las interacciones ecológicas que presentan con los agentes polinizadores y con hongos con los cuales forman micorrizas (Espejo *et al.*, 2002; Lecoufle, 2006).

Las orquídeas son plantas fascinantes. Con frecuencia sus flores son muy bellas e intrincadas y eso tiene principalmente un fin, atraer a los polinizadores para poder producir semillas y perpetuar la especie es por ello que tienen una gran diversidad, las estimaciones recientes del tamaño de esta familia sugieren que deben de existir entre 20 000 y 30 000 especies. Esta enorme diversidad es el resultado de la larga evolución de este linaje desde que la primera orquídea apareció en la Tierra hace unos 100 o 110 millones de años (Hágsater *et al.*, 2015).

El nombre de la familia procede de la palabra griega *orkhis*, que significa testículos, y fue empleado por Teofrasto de Ereso (c. 371- c. 286 a.C.) en su obra “*De causis plantarum*” para nombrar una planta de este grupo. El término hace alusión a la semejanza que presenta la pareja de tubérculos de muchas especies mediterráneas con aquellos órganos (Velazco y Beltrán, 2008).

Debido a que algunos representantes de la familia Orchidaceae aún poseen características primitivas (ej. *Apostasia blume*, *Neuwiedia blume*, *Vanilla mil*), es difícil encontrar caracteres morfológicos que agrupen a todos sus integrantes, existen muy pocas características exclusivas que distinguen a las orquídeas de las demás monocotiledóneas (Chemisquy, 2010; Huerta, 2014).

La familia Orchidaceae en general puede caracterizarse por los siguientes atributos:

- ✓ Posesión de un pétalo modificado, el labelo o labio, que generalmente es diferente en forma y colocación a otros segmentos florales y se ubica frente a las estructuras sexuales.
- ✓ Estructuras reproductivas masculinas y femeninas fusionadas en un órgano único llamado columna o ginostemio.
- ✓ Casi todas las flores de las orquídeas son hermafroditas, solamente en los géneros *Catasetum*, *Cycnoches* y *Mormodes*, las flores tienen sexos separados.
- ✓ Granos de polen cohesionados en masas más o menos sólidas llamados polinios, comúnmente dotados de una extensión pegajosa que permite su adhesión a lugares específicos del cuerpo del polinizador.
- ✓ Semillas diminutas y extremadamente ligeras que son producidas en gran cantidad (de cientos a millones por fruto, dependiendo de la especie) que son dispersadas por el viento y requieren para su germinación el establecimiento de una relación simbiótica con hongos microscópicos.

- ✓ Durante su desarrollo, las flores sufren un proceso de resupinación, donde la flor gira 180° a la altura del pedicelo, causando que el labelo se ubique en la parte inferior de la flor y la columna en la parte superior. Si bien gran parte de la especie poseen flores resupinadas, también se encuentran flores no resupinadas y flores hiper-resupinadas 360°.
- ✓ El róstelo, que forma parte del estigma, usualmente está involucrado en la transferencia de polen entre flores.
- ✓ En la mayoría de las especies, el polen se encuentra agrupado en 2-8 polinias. Las polinias y el róstelo son características asociadas a la polinización por aves e insectos (Dressler, 1981; Anaya, 2003; Hágsater *et al.*, 2005; Chemisquy, 2010).

2.2.1 Distribución y hábitos de crecimiento.

Las orquídeas se encuentran distribuidas por casi todas las regiones del Planeta, faltando sólo en los desiertos extremos y en las tierras permanentemente heladas. La familia está mejor representada en los trópicos, donde se hallan confinadas numerosas especies, muchas de las cuales son plantas epífitas (Velazco y Beltrán, 2008).

Dressler (1981) considera que del total de especies, el 25 % son terrestres, el 5 % capaces de crecer como plantas terrestres y el resto exclusivamente epífitas.

2.2.2 Usos de la familia Orchidaceae.

Las especies más vistosas de orquídeas, han sido conocidas y apreciadas por diferentes culturas desde tiempos muy antiguos, con fines ornamentales, medicinales y místicas. En China y en Japón se conoce su cultivo desde hace al menos 25 siglos. En Grecia, Dioscórides, que vivió en la época de Nerón (siglo I d. C.), en su obra "*Materia médica*", describe varias orquídeas, en particular una planta a la que nombró "Cynosorchis" (testículos de perro) atribuyéndole propiedades afrodisíacas y místicas, ej. Ser "determinantes" del sexo, este ritual consistía en que la mujer se comía los pseudobulbos secos y arrugados para determinar progenie femenina, por otra parte si los pseudobulbos estaban frescos y eran ingeridos por un hombre, determinarían un descendiente masculino (Velasco y Beltrán, 2008; García y Peña, 1981 citado en Huerta, 2014).

Durante la Edad Media, las orquídeas continuaron con la reputación afrodisíaca y fueron relacionadas repetidamente con la fertilidad y la virilidad. En 1731 llegaron a Europa las primeras orquídeas ornamentales, procedentes del Nuevo Mundo, traídas como curiosidades o regalos por los oficiales de barcos mercantiles (Velasco y Beltrán, 2008; Téllez, 2011).

En México, en la época del reinado Azteca de Moctezuma Ilhuicamina (1440-1469) y Axayacatl (469-1482), utilizaban vainilla (*Vanilla planifolia*) como pago de tributos y para aromatizar el chocolate

caliente. En el códice de la Cruz-Badiano, la vainilla aparece ilustrada en 1551 con el nombre de *tlixochitl*, utilizada como herbolaria Azteca y la primera referencia de las orquídeas en el hemisferio occidental (García y Peña, 1981 citado en Huerta, 2014).

El uso principal de las orquídeas en el México precolombino fue para preparar un mucilago, que se obtenía de los cormos deshidratados y molidos de *Laelias*, *Prosthecheas* y *Bletias* y era usado como engrudo o pegamento llamado *tzauhtli* o *tzacutli* en náhuatl para elaborar instrumentos y adornos. El uso del *tzauhtli* ha perdurado hasta nuestros días en la preparación de los alfeñiques, sobre todo calaveras que son parte del Día de Muertos (Hágsater *et al.*, 2015).

En la actualidad las orquídeas son utilizadas, en la medicina tradicional mexicana, por ejemplo: los *Isochilus* son llamados “sanguinarias” y se emplean para curar la disentería; *Arpophyllum spicatum*, *Epidendrum anisatum*, *Bletia campanulata* y *Bletia coccinea* son señalados también para aliviar el mismo mal. Con los pseudobulbos de algunas especies se preparan cataplasmas, por ejemplo con *Catasetum integerrimum*, *Cyrtopodium macrobulbon*, *Bletia purpurea* y *Prosthechea citrina*. En el caso de *Catasetum integerrimum*, los pseudobulbos pelados, salados y asados son usados para aplicarse en forúnculos y heridas. Con las flores de *Laelia autumnalis* se prepara una infusión para aliviar la tos. Los Tepehuanos utilizan los *Malaxis* para hacer infusiones y aliviar dolores de estomago. Las flores molidas de *Calanthe calanthoides* y la savia de *Rhyncholalelia digbyana* detienen las hemorragias en las heridas (Hágsater *et al.*, 2015).

Es bien conocido el uso ornamental de las orquídeas por la diversidad de formas y colores de sus flores, pero fitoquímicamente; sólo algunas especies del género *Vanilla* cuentan con profundos estudios fitoquímicos por su amplio uso en la fabricación de licores y bebidas, cosméticos y aromatizantes (Beltrán y Martínez, 1996). La vainilla es el aromatizante más importante de la industria alimentaria. La producción de vainilla genera en los países exportadores divisas por cerca de 80 millones de dólares anuales (Hágsater *et al.*, 2015).

En la actualidad en Estados Unidos, Inglaterra, Francia, Japón, China, Tailandia, Australia y Singapur se ha profundizado el interés por el cultivo y la explotación, en la producción de flor cortada para abastecer el mercado internacional de floricultura y la comercialización de plantas de diferentes tamaños *Cattleya*, *Dendrobium*, *Epidendrum*, *Paphiopedilum*, *Vanda*, *Brassia*, *Cymbidium*, *Laelia*, *Miltonia*, *Oncidium*, *Encyclia* y *Coelogyne*. Tailandia es uno de los países más especializados en la producción de flores de orquídeas para abastecer la demanda de las principales ciudades alrededor del mundo, con un monto de exportaciones de 40 millones de dólares al año (Tellez, 2011). Los extractos de las flores de orquídeas (*Cattleya*) se han utilizado en la formulación de despigmentantes,

productos antiedad, labiales y capilares. En productos capilares, se ha descubierto que repara el cabello dañado, evita la deshidratación (Alcalde, 2007) (Tabla 1).

Tabla 1 Uso de diferentes especies de la Familia Orchidaceae.

(Beltrán y Martínez, 1996; Rittershausen y Rittershausen, 2004; Soto Arenas, 2006; Alcalde, 2007; Huerta, 2014; Hågsater *et al.*, 2015).

Especie	Uso	Parte utilizada
<i>Arpophyllum spicatum</i>	✓ Medicinal (Contra la disentería).	Tallo macerado.
<i>Bletia campanulata</i> y <i>Bletia coccinea</i> .	✓ Adhesivo.	Cormo.
<i>Bletia purpurea</i>	✓ Medicinal (Afecciones estomacales). ✓ Adhesivo.	Toda la planta. Cormo.
<i>Calanthe calanthoides</i>	✓ Medicinal (Detiene hemorragias).	Flores molidas.
<i>Cattleya spp.</i>	✓ Ornamental. ✓ Productos de cosméticos y capilares.	Flores.
<i>Cyrtopodium punctatum</i>	✓ Medicinal (contra tos, asma y alopecia, usado para cataplasmas dislocaciones, golpes e inflamaciones).	Pseudobulbos.
<i>Dendrobium nobile</i>	✓ Ornamental. ✓ Base de híbridos comerciales.	Flores. Planta completa.
<i>Encyclia cochleata</i>	✓ Medicinal (expectorante y antiasmática).	Pseudobulbos.
<i>Encyclia phoenicia</i>	✓ Medicinal (antihistamínico). ✓ Religioso.	Pseudobulbos. Flores
<i>Epidendrum anisatum</i>	✓ Medicinal (antidisentérico).	No especifica.
<i>Epipactis gigantea</i>	✓ Adhesivo.	Pseudobulbos.
<i>Laelia albida</i> , <i>Laelia anceps</i> y <i>Laelia speciosa</i> .	✓ Ornamental. ✓ Religioso. ✓ Artesanal.	Flores. Planta completa.
<i>Laelia autumnalis</i>	✓ Ornamental. ✓ Adhesivo. ✓ Artesanal. ✓ Medicinal (contra la tos). ✓ Comestible (dulces).	Planta completa.
<i>Malaxis spp.</i>	✓ Medicinal (alivia el dolor de estómago).	Tallos (té).
<i>Oncidium luridum</i>	✓ Medicinal (antiasmático).	Pseudobulbos.
<i>Prosthechea karwinskii</i>	✓ Fragancia.	Pétalos.
<i>Prosthechea michuacana</i> y <i>Prosthechea varicosa</i> .	✓ Medicinal (deshidratación).	Pseudobulbos.
<i>Rhyncholaelia digbyana</i>	✓ Medicinal (detiene hemorragias).	Savia.
<i>Trichocentrum cebollata</i>	✓ Alucinógeno.	Hojas
<i>Vanilla dilloniana</i>	✓ Medicinal (desparasitante). ✓ Aromatizante.	Pseudobulbos. Fruto seco.
<i>Vanilla phaeantha</i>	✓ Medicinal (desparasitante). ✓ Aromatizante.	Pseudobulbos. Fruto seco.
<i>Vanilla planifolia</i>	✓ Aromatizante. ✓ Saborizante. ✓ Medicinal (contra sífilis, úlceras, reumas, fiebre, amenorrea y desparasitante). ✓ Afrodisiaca.	Fruto seco. Pseudobulbos.

2.3 Las orquídeas en México.

2.3.1 Distribución de Orquídeas en México.

A las orquídeas se les encuentra en todo el país pero son más abundantes en zonas cálido-húmedas (Lecoufle, 2006). Las regiones más ricas en orquídeas se localizan en la zona de Puerto Vallarta y la Sierra de Manantlán, en Jalisco; Temascaltepec, en Estado de México; el sistema Teotihuacán, en Guerrero; la Sierra Juárez, la región de Teojomulco y Los Chimalapas en Oaxaca; y en la región Lacandona, así como en la Sierra Madre de Chiapas. La región con mayor riqueza de especies se ubica en la selva baja de Montebello, Chiapas, con 90 taxa por hectárea y en el estado de Veracruz, aunque todos los estados presentan por lo menos una especie (Soto y Salazar, 2004; Téllez, 2011).

Las orquídeas ocupan el tercer lugar a nivel nacional en lo referente a las familias de plantas con mayor diversidad taxonómica, siendo superadas sólo por Asteraceae y Fabaceae (Villaseñor, 2003; Hágsater *et al.*, 2005). Debido a sus flores bellas y vistosas, algunos de sus componentes son de gran interés hortícola, por lo que han sido objeto de una fuerte presión por parte de los recolectores; tal es el caso de los géneros *Laelia*, *Barkeria*, *Euchile* y *Prosthechea* (García *et al.*, 2003).

2.4 El género *Laelia* en México.

Tradicionalmente, especies como *L. albida*, *L. anceps*, *L. gouldiana*, *L. autumnalis* y *L. furfuracea*, han sido cultivadas y apreciadas por los distintos grupos humanos de México y sus flores han sido utilizadas durante siglos como ofrendas en festividades de “Día de muertos”. De allí. Los nombres comunes de algunas especies: “Calaverita”, “lirio de todos los santos”, “flor de muerto”, “flor de las animas”, etc. Otras especies que florecen en distintos meses del año, se relacionan con otras festividades populares tales como el “Día de las madres”, el de la “Virgen de Guadalupe” y fiestas patronales de los pueblos. La flor del *tatanache* (*L. albida*), son un adorno común en las tumbas, altares y también en los nacimientos de la época navideña. En varias de nuestras ciudades se venden en los mercados flores silvestres de *Laelias* generalmente a precios muy bajos (Halbinger y Soto, 1997; Hágsater *et al.*, 2015).

2.4.1 Características del género *Laelia*.

El género *Laelia* fue establecido en 1831 por el botánico Inglés John Lindley en su obra “*The Genera and Species of Orchidaceous Plants*”, donde aparecen dos especies, *Laelia grandiflora* y *Laelia autumnalis*. *Laelia grandiflora* es conocida hoy como *L. speciosa*, y es la especie tipo del género (Halbinger y Soto, 1997).

Laelia forma parte de los 43 géneros que constituyen la subtribu *Laeliinae*. (Dressler, 1993).

El género es endémico de México y se reportan 12 especies de *Laelia*: *L. albida*, *L. anceps* con 2 subespecies (*anceps* y *dawsonii*), *L. aurea*, *L. autumnalis*, *L. crawshayana*, *L. eyermaniana*, *L. furfuracea*, *L. gouldiana*, *L. halbingeriana*, *L. rubescens*, *L. speciosa*, y *L. superbiens* (Halbinger y Soto, 1997; Salazar *et al.*, 2006).

2.4.2 Descripción.

Plantas formadas por una sucesión de brotes similares (isomodulares). Cada brote emerge de la yema de renuevo del brote anterior. El **rizoma** es de hecho el simpodio formado por un conjunto de entrenudos basales de los brotes. Las **raíces** son flexosas, redondeadas en sección transversal, cubiertas por velamen; el ápice de la raíz es generalmente de color verde, las raíces jóvenes son carnosas y al menos parcialmente fotosintéticas. Cuentan con **pseudobulbos** muy engrosados constituidos por uno o más entrenudos, frecuentemente se encuentran dispuestos de tal forma que producen dos hileras con pseudobulbos subsecuentes alterados, en cada nudo del pseudobulbo una **vaina** es producida, la cual se mantiene verde solo durante el desarrollo del brote, ya que al final de la estación de crecimiento la vaina se seca y se vuelve escariosa, ésta cubre al pseudobulbo por un par de años para luego desaparecer. Las **hojas**, éstas con la base corta y la lámina ancha; frecuentemente son carnosas y rígidas, de color verde, teñidas de morado cuando están bajo fuertes intensidades de luz. El ápice del pseudobulbo porta una **inflorescencia** simple, con un pedúnculo formado por entrenudos que portan las brácteas de varios tamaños, terminando en un racimo; las **brácteas florales** en los nudos del racimo son de color verde, algunas veces presentan nectarios extraflorales que son pegajosos y brillantes. El **ovario** es subcilíndrico, con seis surcos, de color verde. Las **flores** son usualmente resuspinadas, el color puede ser blanco, amarillo o más comúnmente lila- magenta. Los **sépalos** son similares a los pétalos, pero más estrechos y más carnosos, son casi iguales entre sí y extendidos. Los **pétalos** son más amplios que los sépalos, están extendidos o parcialmente paralelos al labelo/columna; la base es cuneada, la lámina es oblongo-oblancoada a rómbica, de plana recurvada, a veces ondulada, con surco longitudinal en la superficie externa. El **labelo** es libre desde la columna, trilobulado, sujeto a la columna por una uña corta; la base de lámina es plana a cóncava y muy redondeada; los lóbulos laterales están flexionados hacia arriba y forman un tubo alrededor de la columna, el lóbulo medio es plano a recurvado; el disco está adornado con un callo de simple a complejo formado de 3 a muchas quillas o una placa basal gruesa: la garganta está marcada con una mancha o líneas ramificantes, pero éstas pueden estar ausentes en algunas especies; hay un surco axial longitudinal en la superficie externa. La **columna** es ligera a fuertemente arqueada, semiclaviforme a semicilíndrica, hay un cunículo de profundidad variable; usualmente es de color amarillo y con puntos en la base; los márgenes ventrales son algo prominentes, en algunas ocasiones con una amplia base alada, o más prominente cerca de la cavidad estigmática; el clinandrio es cóncavo y tiene de 1 a 3 dientes, el medio más

prominente, deflexo, que presiona fuertemente la antera, y los márgenes son enteramente erosos. La **antera** cuenta con ocho celdas; puede ser ovada o bilobulada. El **polinario** posee ocho polinios fuertemente aplanados lateralmente, en cuatro pares, en cada par de polinio superior (proximal) y el inferior (distal) son ligeramente de distinto tamaño y forma. La **cavidad estigmática** es transversal elíptica o triangular, a veces trilobulada, de expuesta a oculta, profundamente cóncava a poco profunda, los lóbulos laterales visibles o no, a veces proyectada a la base. El **róstelo** está bien desarrollado, formando una lámina transversal oblonga a ovada, carnosa y convexa, que separa completamente el área estigmática receptiva de la antera; en la superficie abaxial del róstelo puede hacer un viscario poco definido (un área difusa y pegajosa) o bien definido, la sustancia pegajosa sirve para unir el polinario al cuerpo del insecto y la **cápsula** es elipsoide, con un pedúnculo corto y un pico apical, tiene nervaduras y hendiduras (Fig. 1; Halbinger y Soto 1997).

Según la morfología de las flores, las *Laelias* deben ser polinizadas por insectos, abejorros y en ocasiones de forma menos efectiva por abejas. Existen observaciones de la polinización de *L. anceps*, *L. autumnalis* y *L. speciosa*, por varias especies de abejorros del género *Bombus* (Halbinger y Soto, 1997). También se ha sugerido que *L. rubescens* es polinizada por colibríes (Trappnell y Hamrick, 2005).

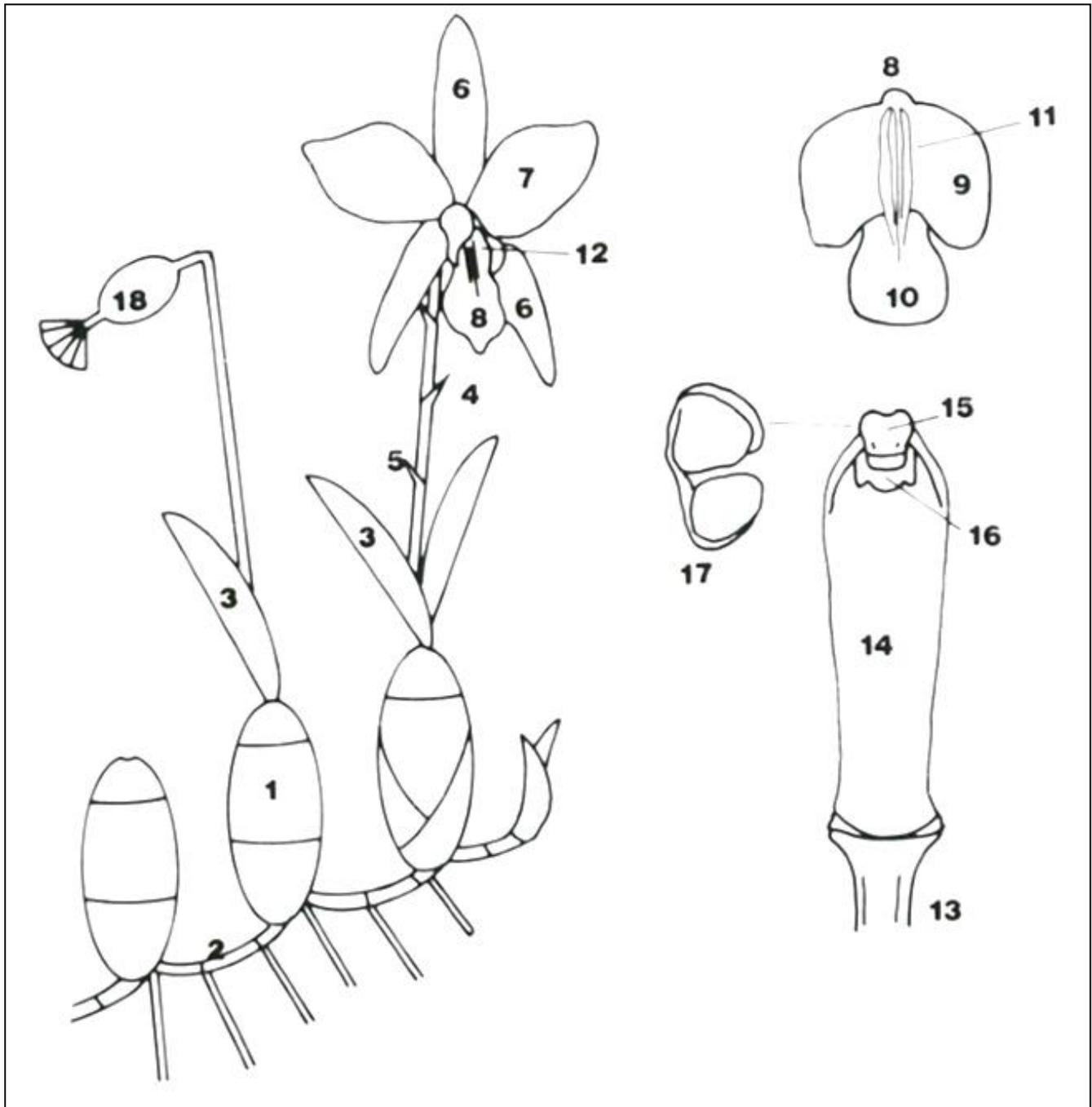


Fig. 1 Morfología del género *Laelia*.

1: Pseudobulbos; 2: Rizomas; 3: Hojas; 4: Inflorescencia; 5: Bráctea; 6: Sépalos; 7: Pétalos; 8: Labelo; 9: Lóbulos laterales; 10: Lóbulo medio; 11: Quillas; 12: Garganta; 13: Ovario; 14: Columna; 15: Antera; 16: Estigma; 17: Polinario y 18: Cápsula o fruto (Halbinger y Soto 1997).

2.4.3 Ecología y distribución.

Las *Laelias* son en su mayoría plantas epifitas xerófilas, tienen una gran tendencia a desarrollarse en encinos del género *Quercus*, ocasionalmente es posible encontrarlas sobre rocas que cuentan con condiciones ambientales favorables (Halbinger y Soto, 1997).

Las *Laelias* se distribuyen en una superficie importante del país, mostrando un patrón geográfico característico: en las zonas montañosas del Oeste y Sur del país, ya que solo dos especies (*L. anceps* y *L. speciosa*) se encuentran en las serranías del vértice del golfo de México, como es el caso de la Sierra Madre Oriental. Al parecer, el Istmo de Tehuantepec se puede considerar una barrera natural para las *Laelias*, ya que solo dos especies se hallan presentes en ambos lados de esta formación (*L. anceps* y *L. rubescens*), la mayoría de las *Laelias* adaptadas a condiciones comparativamente xéricas y frías. La entidad federativa con mayores representantes de este género es Jalisco con siete especies, seguido por Michoacán con seis especies (Fig. 2; Huerta, 2014).

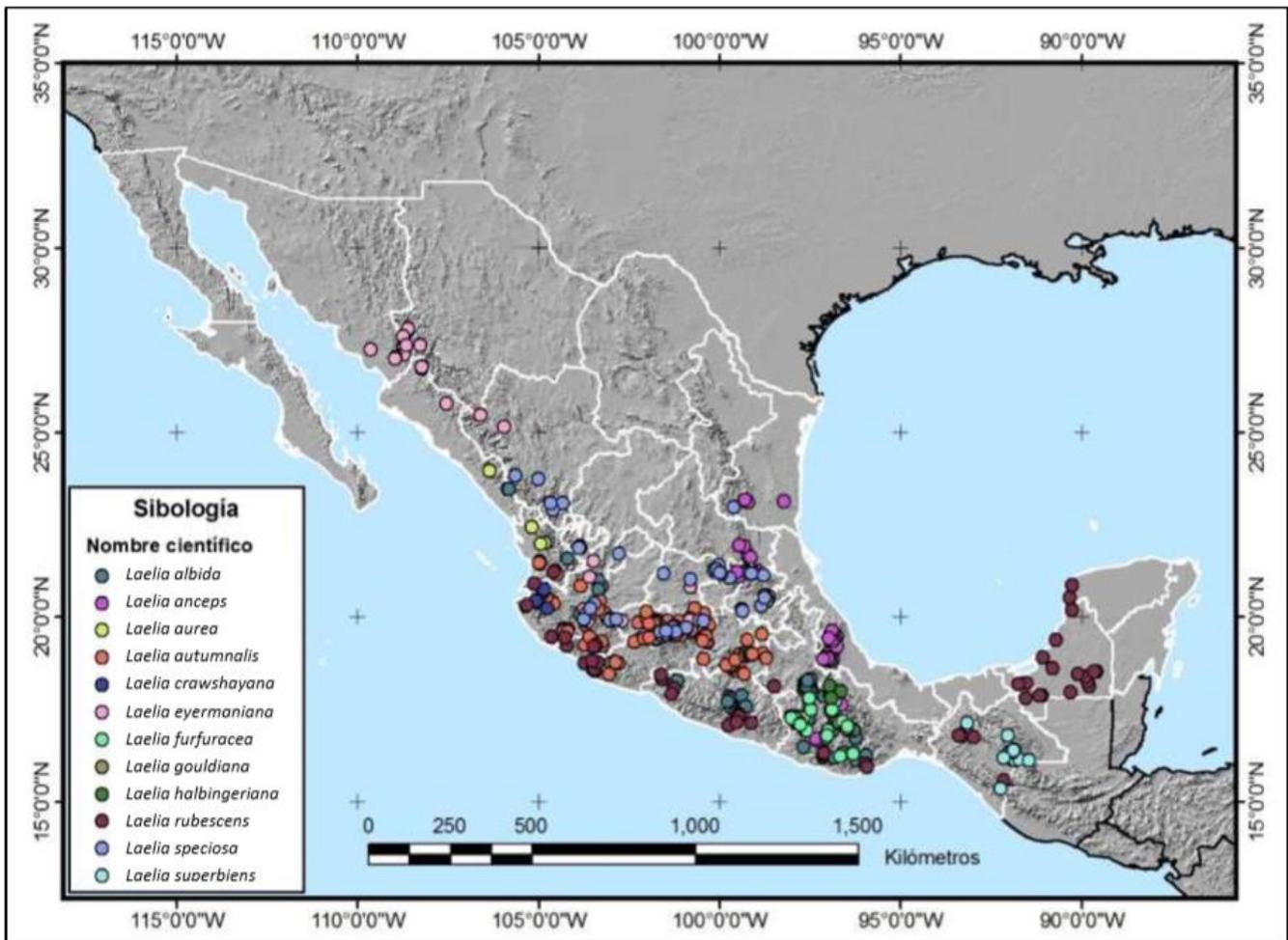


Fig. 2 Distribución del Género *Laelia* en México. (Tomado de Huerta, 2014).

2.5 *Laelia albida* Batem ex Lindl.



Fig. 3 Flor de *Laelia albida*.

Clasificación taxonómica (Dressler, 1993).

- ✓ **Reino:** *Plantae*
- ✓ **División:** *Magnoliophyta*
- ✓ **Clase:** *Liliopsida*
- ✓ **Orden:** *Asparagales*
- ✓ **Familia:** *Orchidaceae*
- ✓ **Subfamilia:** *Epidendroideae*
- ✓ **Tribu:** *Epidendreae*
- ✓ **Subtribu:** *Laeliinae*
- ✓ **Género:** *Laelia*
- ✓ **Especie:** *Laelia albida*.

Nombres comunes: "Huichila" (Oaxaca), "lirio de San Francisco", "monjitas", "tzicxóchitl", "flor de tatanachtle" (Fig. 3).

2.5.1 Descripción.

Las **Raíces** son sencillas, redondas, 1.5-2.3 mm de grosor, el **Rizoma** muy corto, formado por 2-3 entrenudos, 4-9 mm de largo, 4-9 mm de grosor. Los **Pseudobulbos** cónico-ovoides, con 2-3 hojas terminales, color verde claro, 40-74 mm de altura, 15 a 31 mm de ancho, 15 a 28 mm de grosor. Las **Hojas** 1 a 3, usualmente 2, coriáceas, carnosas, rígidas, verde, por lo general impregnada de púrpura, 7-27 x 0.9-2.2 cm. La **Inflorescencia** erecto-arqueada, 10 a 90 cm de largo, color verde a púrpura, mide 2 a 4.5 mm de grosor, de 6 a 9 brácteas tubulares, racimo alargado con 4 a 12 flores, el raquis 9.5 a 19 cm de largo. Las **Brácteas florales** triangulares a ovadas, de 5 -14 x 4-6 mm. Las **Flores** pequeñas, resupinadas, 2.5 a 4 cm diámetro, tépalos y labelo crema-blanco, blanco- rosado, rara vez enteramente rosa-rosa ó crema- amarillo, labio con venas purpúreas en la garganta, lóbulo medio con frecuencia impregnada de color rosa, columna blanca de rayas púrpura en la superficie ventral; fuertemente fragante, fragancia dulce. El **Ovario** pedicelado, arqueado, sulcado, engrosado hacia el ápice, verde con manchas oscuras, glutinoso, de 19-23 mm de largo, 1.5- 2.7 mm de grosor. Los **Sépalos** esparcidos, bastante rígidos y carnosos. Sépalo dorsal lanceolado-elíptico, agudo, de 24-33 x 6-11 mm. Sépalos laterales lanceolado-elípticos, ligeramente oblicuos a ligeramente falcados, agudos, de 21-29 x 7-12 mm. Los **Pétalos** ovado-elípticos a rómbicos, oblicuos, con el ápice recurvado, agudo a obtuso, los márgenes enteros a ligeramente ondulados, de 21-30 x 10-20 mm. El **Labelo** arqueado, de 19-23 mm de largo total y 13-19 mm formado por tres lóbulos ligeramente ondulados, es cremoso o rosado, en la mitad del lóbulo medio es de color amarillo con manchas púrpura. La **Columna** esbelta y arqueada, de color blanca, manchada de púrpura en la base, de 13-17 mm de largo y 3.5-4 mm de ancho a nivel de la cavidad estigmática. La **Antera** ovoide - subcuadrada, 8-locular, blanco- café, de 2.7 x 2 mm de largo, 2 mm de ancho, 2 mm de grosor. El **Polinario** de 2 mm de largo y 2.3 mm de ancho, con 8 polinios lateralmente comprimidos. El **Rostelo** laminar, subcuadrado, blanco, cubriendo parcialmente la cavidad estigmática, de 1.5-2.3 mm. La **Cavidad estigmática** cóncava, transversalmente elíptico-subcuadrada, de 2.5-3.5 mm y la **Cápsula** elipsoide, de 2-3.5 cm de largo y de 0.9-1.5 cm de grosor, pedicelada (Fig. 5; Halbinger y Soto, 1997).

2.5.2 Hábitat.

L. albida crece de forma epífita sobre Mezquite (*Prosopis laevigata*) y el Zapote blanco (*Casimiroa edulis*). También se encuentra creciendo sobre otros árboles: Amate (*Ficus* spp.), Encino (*Quercus* spp.), Palo verde (*Cercidium praecox*), Pirul (*Schinus molle*), Sotol (*Dasyllirion* spp.), Sotolin (*Beucarnea gracilis*), Tempesquistle (*Bumelia laetevirens*) y Xoconostle (*Stenocereus stellatus*). Probablemente la diversificación de estos soportes le ha ayudado a sobrevivir en las condiciones semiáridas. Ocasionalmente es litófita (Fig. 4; Santos, 2002).



Fig. 4 *L. albida* creciendo sobre un árbol de Mezquite.
(Halbinger y Soto, 1997).

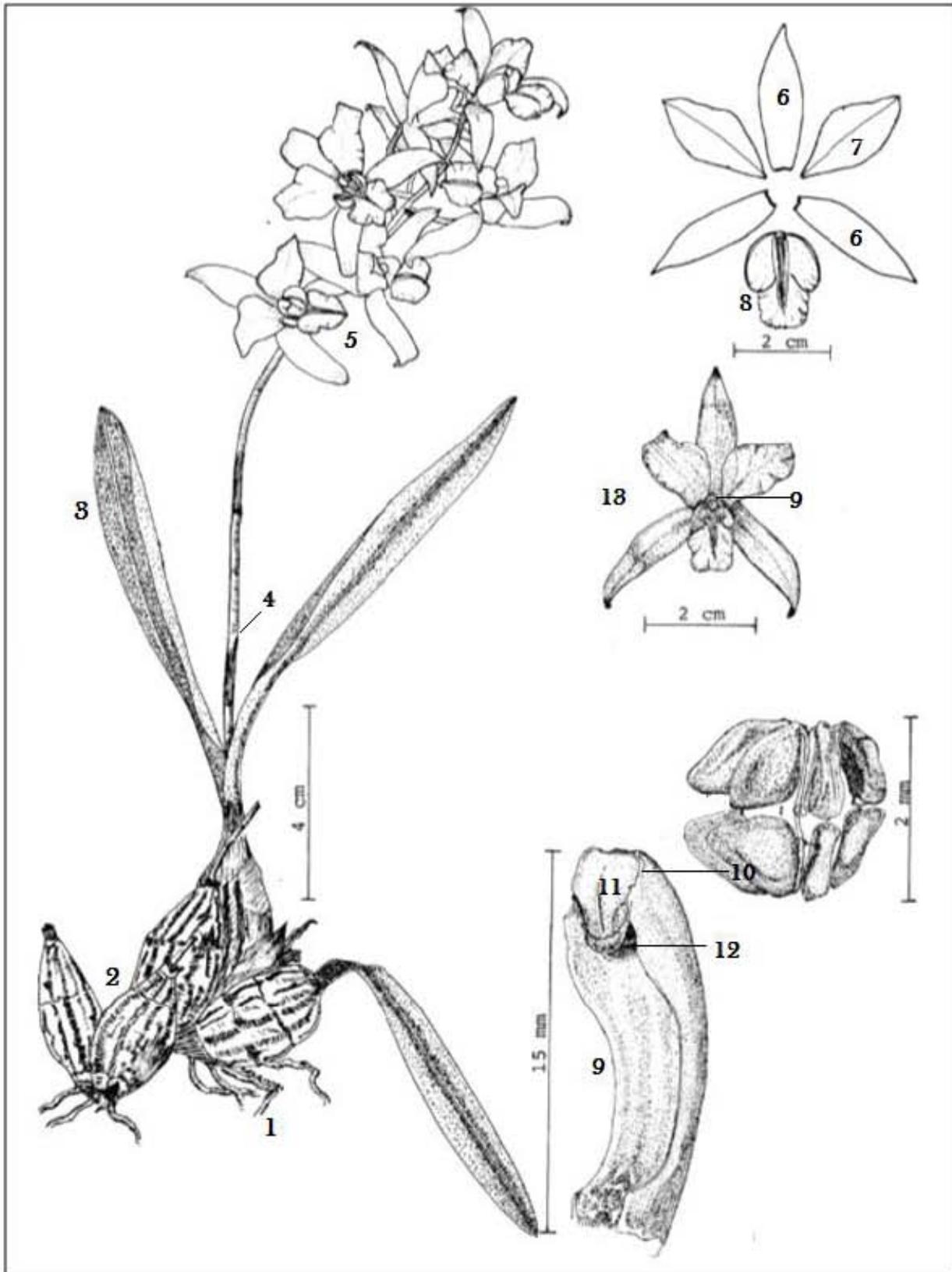


Fig. 5 Morfología de *L. albida*.

1: Raíces; 2: Pseudobulbos; 3: Hoja; 4: Bráctea; 5: Inflorescencia; 6: Sépalos; 7: Pétalos; 8: Labelo; 9: Columna; 10: Polinario; 11: Antera; 12: Cavidad estigmática y 13: Flor (Halbinger y Soto, 1997).

2.5.3 Distribución.

A unos 1700 a 2000 m se presenta *L. albida* la cual, es una especie endémica de la Sierra Madre Occidental y la Sierra Madre del Sur un territorio sumamente extenso, ya que se ha encontrado desde Sinaloa, Durango, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Puebla en el valle de Tehuacán Cuicatlán a unos 1600 a 1900 m hasta Cerca de Sola de Vega y en Oaxaca (Fig. 6; Halbinger y Soto, 1997; Hágsater *et al.*, 2015).

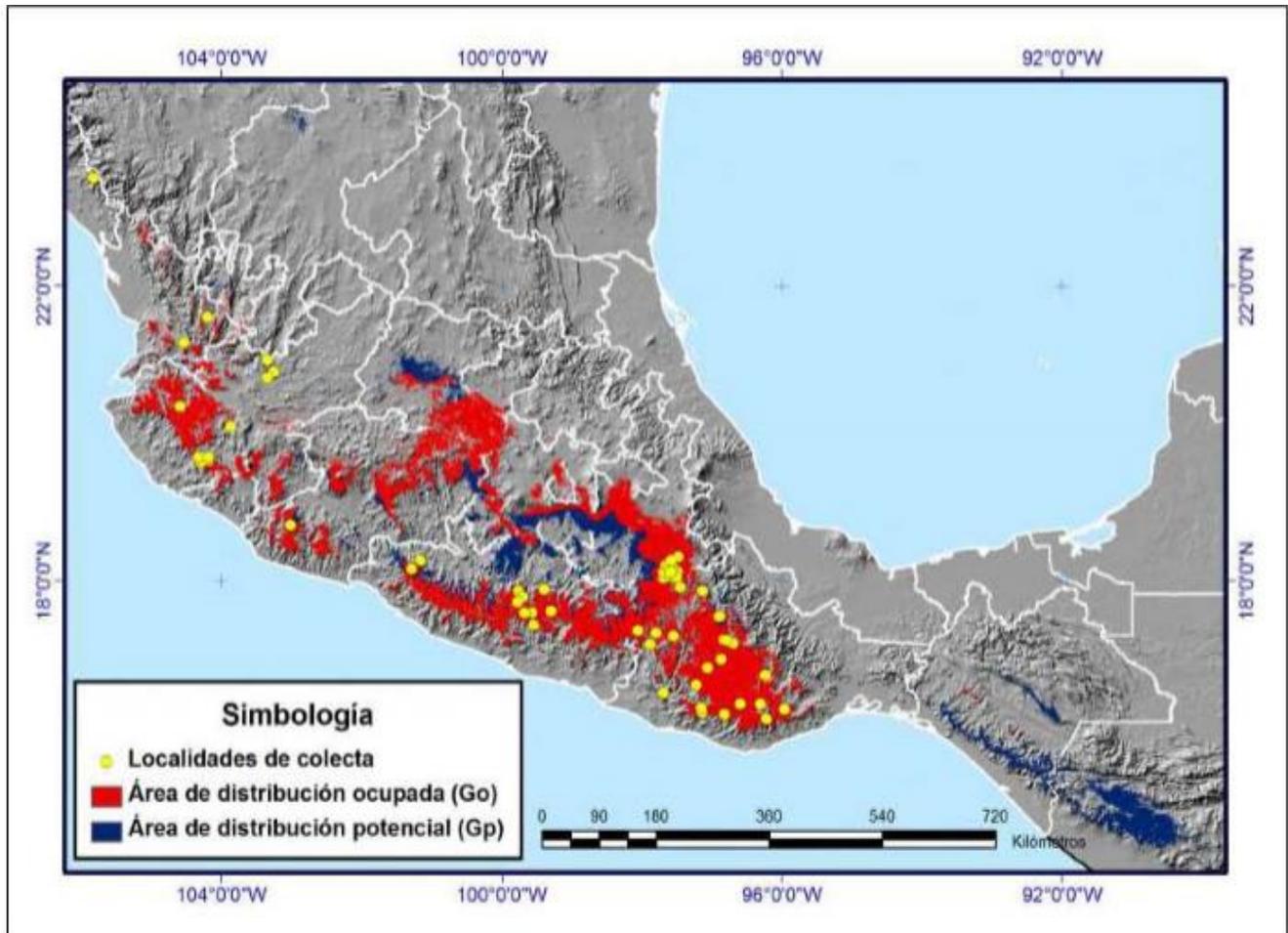


Fig. 6 Distribución de *L. albida*.

Go= áreas que poseen condiciones bióticas y abióticas apropiadas a la especie. Gp= áreas ambientalmente correctas para la sobrevivencia de la especie, pero no ha sido localizada. (Tomado de Huerta, 2014).

2.6 Problemática de las orquídeas.

En los últimos 50 años, los seres humanos hemos transformado los ecosistemas del mundo más rápida y extensamente que en ningún otro periodo de la historia. La alteración que muestran los ambientes naturales del país por la presión humana ejercida sobre ellos, el mal uso y abuso incrementado en exceso de los recursos naturales. Actualmente, se reconoce que las principales amenazas a la biodiversidad, tanto en México como en el mundo, son el cambio de uso del suelo (impulsado principalmente por la expansión de la frontera agropecuaria y urbana), el crecimiento de la infraestructura (p. e., para la construcción de carreteras, redes eléctricas y represas), los incendios forestales, la sobreexplotación de los recursos naturales, la introducción de especies invasoras, la contaminación, el aprovechamiento ilegal, sequías, deslizamientos de tierra, plagas forestales, fenómenos meteorológicos extremos y, más recientemente, la liberación a la atmósfera de una gran cantidad de gases de efecto invernadero, lo cual exacerba el problema del cambio climático. Estas rápidas y profundas transformaciones, han impactado procesos ambientales locales, regionales y globales, acelerando la pérdida de la biodiversidad y provocando la pérdida o el deterioro de muchos servicios ambientales como la disponibilidad del agua, la regulación del clima y la regulación de los ciclos biogeoquímicos, entre otros. La deforestación en México ha alcanzado niveles alarmantes y se ha estimado en 4.2 % anual, también se ha calculado que el 75 % del territorio del país ya ha sido deforestado (Hágsater *et al.*, 2015; SEMARNAT, 2013).

La destrucción de la cobertura vegetal, por la gran demanda del consumo de maderables, directa e indirectamente se destruyen también las orquídeas siendo que éstas se reproducen adheridas a las copas de los árboles. Así como la extracción ilegal de orquídeas silvestres para su comercio por sus numerosas especies ornamentales hace que estén consideradas en peligro de extinción. La disminución de las poblaciones de muchas especies es muy significativa y si bien tal vez éstas no lleguen a extinguirse, seguramente se continuará perdiendo una parte importante de su variación genética y con ella, la capacidad de sobrevivencia de las especies. Se sabe que en los últimos dos siglos se extinguieron dos especies de orquídeas en el país y a partir de 1998 se han extinguido al menos 22 más. Es previsible que esta tendencia siga aumentando como un reflejo de la problemática ambiental que enfrenta el país (Hágsater *et al.*, 2015; Flores, 2011; Terán y Cuesta, 2012).

2.7 Alternativas de conservación.

La conservación tanto de la flora como de la fauna se desarrolla en dos formas básicas: dentro del hábitat natural o conservación *in situ* y fuera del mismo, es decir, conservación *ex situ* (Lascuráin *et al.*, 2009).

2.7.1 Conservación *in situ*.

En los últimos años, en México ha habido un avance notable en la legislación y normatividad en cuestiones ambientales. En la consolidación de instrumentos que buscan proteger y detener la pérdida de la superficie remanente de ecosistemas naturales, con lo cual, además de salvaguardar a ecosistemas y especies representativas de la biodiversidad nacional, se conservan los servicios ambientales de muchas regiones del país. Dentro de ellos se encuentran, fundamentalmente, las áreas naturales protegidas, los humedales y los programas de pagos por servicios ambientales (SEMARNAT, 2013).

La Ley General de Vida Silvestre (LGEEPA) ha establecido en su artículo 56, que la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), debe de identificar a través de listas, las especies o poblaciones en riesgo (actualizadas cada 3 años o antes si se presenta información para la inclusión, exclusión o cambio de categoría de alguna especie o población). En la Norma Oficial Mexicana 059-SEMARNAT 2010, son enlistadas las especies o poblaciones de flora y fauna silvestres en riesgo (anfibios, aves, hongos, invertebrados, mamíferos, peces, plantas y reptiles) (NOM-059 SEMARNAT, 2010). Las plantas son el grupo taxonómico con mayor número de especies en riesgo, las familias con mayor número de especies en riesgo son las cactáceas (244 especies, que equivalen al 23.6 % del total de especies de esta familia descritas para el país), las orquídeas (188 especies, 16.2 %), las palmas (64 especies, 51.6 %) y los agaves (39 especies, 13.7 %) (NOM 059 SEMARNAT, 2010; SEMARNAT, 2013).

En la familia Orchidaceae se enlistan 90 géneros y 188 especies, de las cuales 75 son orquídeas endémicas. Están categorizadas de la manera siguiente:

- ✓ Especies amenazadas (**A**) 62 especies, es decir, aquellas que podrían llegar a encontrarse en peligro de desaparecer a corto o mediano plazo, si siguen operando los factores que inciden negativamente en su viabilidad, al ocasionar el deterioro o modificación de su hábitat o disminuir directamente el tamaño de sus poblaciones;
- ✓ Especies sujetas a protección especial (**Pr**) 110 especies, aquellas que podrían llegar a encontrarse amenazadas por factores que inciden negativamente en su viabilidad, por lo que se determina la necesidad de propiciar su recuperación y conservación o la recuperación y conservación de poblaciones de especies asociadas;

- ✓ Especies en peligro de extinción (**P**) 15 especies, aquellas cuyas áreas de distribución o tamaño de sus poblaciones en el Territorio Nacional han disminuido drásticamente poniendo en riesgo su viabilidad biológica en todo su hábitat natural, debido a factores tales como la destrucción o modificación drástica del hábitat, aprovechamiento no sustentable, enfermedades o depredación, entre otros.
- ✓ Especies probablemente extintas en el medio silvestre (**E**) 1 especie, aquella especie nativa de México cuyos ejemplares en vida libre dentro del Territorio Nacional han desaparecido, hasta donde la documentación y los estudios realizados lo prueban, y de la cual se conoce la existencia de ejemplares vivos, en confinamiento o fuera del Territorio Mexicano y es una especie del género de *Laelia* (NOM 059-SEMARNAT, 2010).

La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) ubica 880 especies de orquídeas mexicanas en la lista de especies en riesgo de extinción. La Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES), se encuentra la familia entera de Orchidaceae incluida en el apéndice II, esto implica que se está regulando el comercio para que, en algunos casos se logre evitar o disminuir al máximo la depredación ilegal de especies silvestres. Estos son los instrumentos legales nacionales e internacionales que regulan, controlan y verifican la subsistencia de la orquideoflora (UICN, 2017; Flores, 2011).

2.7.1.1 Áreas Naturales Protegidas (ANP)

Las áreas protegidas federales, se crean mediante un decreto presidencial y las actividades que pueden llevarse a cabo en ellas se establecen de acuerdo con la legislación ambiental, así como en su Programa de Manejo (PM). El Programa de Manejo es el instrumento que especifica las políticas, estrategias y actividades permitidas compatibles con la conservación, protección y aprovechamiento de sus recursos naturales (CONANP, 2016).

Las áreas naturales son superficies representativas de diversos ecosistemas, en donde el ambiente original no ha sido alterado significativamente por la actividad humana, las cuales proporcionan servicios ambientales de diversos tipos y albergan recursos naturales o especies de importancia ecológica, económica y cultural. Sus objetivos son:

- ✓ Preservar los ambientes naturales representativos de las diferentes regiones biogeográficas y ecológicas y de los ecosistemas más frágiles, para asegurar el equilibrio y la continuidad de los procesos evolutivos y ecológicos.
- ✓ Salvaguardar la diversidad genética de las especies silvestres de las que depende la continuidad evolutiva; así como asegurar la preservación y el aprovechamiento sustentable de la biodiversidad del territorio nacional, en particular preservar las especies que están en

peligro de extinción, las amenazadas, las endémicas, las raras y las que se encuentran sujetas a protección especial.

- ✓ Asegurar el aprovechamiento sustentable de los ecosistemas y sus elementos; Proporcionar un campo propicio para la investigación científica y el estudio de los ecosistemas y su equilibrio; Generar, rescatar y divulgar conocimientos, prácticas y tecnologías, tradicionales o nuevas que permitan la preservación y el aprovechamiento sustentable de la biodiversidad del territorio nacional (LGEEPA, 2012).

En las zonas núcleo de las áreas naturales protegidas queda expresamente prohibido:

- ✓ Verter o descargar contaminantes en el suelo, subsuelo y cualquier clase de cauce, vaso o acuífero, así como desarrollar cualquier actividad contaminante;
- ✓ Interrumpir, rellenar, desecar o desviar los flujos hidráulicos;
- ✓ Realizar actividades cinegéticas o de explotación y aprovechamiento de especies de flora y fauna silvestres y extracción de tierra de monte y su cubierta vegetal;
- ✓ Introducir ejemplares o poblaciones exóticos de la vida silvestre, así como organismos genéticamente modificados (LGEEPA, 2012).

La Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas administra actualmente 182 áreas naturales de carácter federal que representan 908,395.20 km² (Tabla 2) (CONANP, 2018).

Tabla 2 Categorías de las áreas naturales protegidas federales en México (CONANP, 2018).

Categoría	Número de ANP	Extensión en km²
Reservas de la Biosfera	45	777,615.30
Parques Nacionales	66	14,113.19
Monumentos Naturales	5	162.69
Áreas de protección de Recursos Naturales	8	45,033.45
Áreas de protección de Flora y Fauna	40	69,968.64
Santuarios	18	1,501.93
Total	182	908,395.20

2.7.2 Conservación *ex situ*.

La conservación *ex situ* tiene dos principales variantes: la propagación y el mantenimiento de las especies que ya no pueden subsistir en la naturaleza, y otra modalidad que consiste en la propagación masiva y subsecuente comercialización de la mayor cantidad de especies por parte del mayor número posible de personas, lo que es de suma importancia porque reduce y desalienta la colecta de ejemplares en la naturaleza (Hágsater *et al.*, 2015).

Para la conservación también existen instituciones encargadas de la documentación de la biodiversidad y el impulso a los programas que buscan mejorar la calidad de vida de la población a través del estímulo a la explotación de los recursos naturales presentes en sus comunidades (principalmente los recursos forestales y faunísticos), tratando de garantizar que ésta no rebase la capacidad de los mismos recursos para recuperarse y mantenerse en niveles que permitan su extracción en el largo plazo. Destacan los programas de aprovechamiento de la vida silvestre y de desarrollo forestal (Tabla 3) (SEMARNAT, 2013; Hágsater *et al.*, 2015).

Tabla 3 Métodos *ex situ* de conservación de plantas.

(Lascuráin *et al.*, 2009; Sánchez y Jiménez, 2010; Menchaca *et al.*, 2012). Abreviaturas- CDMX: Ciudad de México; CINEVESTAV: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados; CONAFOR: Comisión Nacional Forestal; CTV: Cultivo de Tejidos Vegetales; FES: Facultad de Estudios Superiores; IB: Instituto de Biología; INAH: Instituto Nacional de Antropología e Historia; SEMAHN: Secretaría de Medio Ambiente e Historia Natural; UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México).

Método <i>ex situ</i> .	Descripción.	Ejemplos en México
Jardines botánicos	<p>Un jardín botánico se define como “una institución que mantiene colecciones documentadas de plantas vivas con el propósito de realizar investigación científica, conservación, exhibición y educación”.</p> <p>Algunas de las características y funciones propias de un jardín botánico son: “que las plantas estén adecuadamente etiquetadas, que el jardín mantenga comunicación con otros jardines botánicos, organizaciones y público en general, que esté abierto al público y asuma la responsabilidad y compromiso a largo plazo para el mantenimiento de las colecciones de plantas”.</p>	<p>✓ Jardín Botánico del Instituto de Biología UNAM. CDMX.</p> <p>✓ Jardín Botánico “Dr. Faustino Miranda”, Instituto de Historia Natural y Ecología; Chiapas.</p> <p>✓ Jardín Etnobotánico, INAH Cuernavaca, Mor.</p> <p>✓ Jardín Botánico “Francisco Javier Clavijero”; Veracruz.</p>
Banco de semillas.	<p>Semillas almacenadas en condiciones de baja humedad y temperatura; usado rutinariamente para semillas de cultivos ortodoxos y especies silvestres.</p>	<p>✓ Banco de semillas de zonas áridas y semiáridas de México. FES Iztacala UNAM.</p> <p>✓ Banco de semillas, SEMAHN Chiapas.</p>

Continúa Tabla 3 Métodos <i>ex situ</i> de conservación de plantas		
Unidades de Manejo Ambiental (UMA).	<p>Una de las estrategias de conservación es promover el aprovechamiento sustentable en las comunidades rurales, mediante el registro de viveros como UMA, lo que permitirá disminuir la presión que ejerce la recolección sobre sus poblaciones. Debido a la dificultad para que sus semillas germinen y el tiempo que se invierte en obtener plantas por división vegetativa, los viveros rurales tienen que estar en coordinación con centros de reproducción masiva, donde se pueden obtener plantas en cantidades suficientes para su comercialización mediante técnicas de micropropagación.</p> <p>Además, es factible propagar materiales selectos con características ornamentales atractivos, los cuales les aportan valor agregado para su venta.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Vivero Anatolia Coatepec; Veracruz. ✓ La Selva Catemaco; Veracruz. ✓ Nace el Rio Actopan; Veracruz. ✓ La Joya de Guadalupe Atlixco; Puebla. ✓ Orquidario La Encantada; Oaxaca.
Criopreservación.	<p>Semillas, polen o tejidos congelados en Nitrógeno líquido (-196°C), método para el almacenamiento a largo plazo de taxa agrícolas u hortícolas, usado cada vez más para especies silvestres.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Centro Nacional de Recursos Genéticos; Jalisco, Guadalajara. ✓ Laboratorio de Biotecnología y Criobiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Químicas. Veracruz.
Bancos de Germoplasma.	<p>Los bancos de germoplasma <i>in vitro</i> son sitios para la conservación de los recursos genéticos en condiciones controladas de laboratorio y que involucran diversas técnicas de cultivo y almacenamiento <i>in vitro</i> y son de importancia agrícola y alimenticia.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Banco de Germoplasma Vegetal Coahuila CONAFOR. ✓ Banco de Germoplasma Gobierno; Tabasco. ✓ Banco de Germoplasma El tequio; Oaxaca.
Almacenamiento de Cultivos de Tejidos Vegetales.	<p>Tejidos somáticos y semillas que se propagan <i>in vitro</i>, usados para la proliferación de plantas clonales y producción controlada de semillas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Laboratorio CTV, del Jardín Botánico del IB UNAM; CDMX. ✓ Laboratorio de CTV CINVESTAV Unidad, Irapuato. ✓ El Laboratorio de CTV del Campus Córdoba-Veracruz, Colegio de Postgraduados.

2.7.2.1 Cultivo tradicional de *Laelia*.

El cultivo tradicional de las orquídeas ha perdurado hasta nuestros días y el ejemplo más palpable es el cultivo de *Laelias*, sobre todo en zonas indígenas de Oaxaca, Guerrero, Puebla, Michoacán, Hidalgo y Chiapas. El cultivo tradicional tuvo por consecuencia la conservación *ex situ* de dos orquídeas que no se conocen actualmente en la naturaleza: la monjita (*L. gouldiana*) y la calaverita (*L. anceps* subsp. *dawsonii* f. *chilapensis*). De no haber sido porque algunas personas aprendieron a cultivarlas hace cientos de años, estas plantas no hubieran llegado hasta nuestros días. La conservación por métodos convencionales es muy cara y enfrenta problemas muy complejos, sobre todo porque lo que se persigue es mantener una especie fuera de su hábitat por periodos muy largos. El cultivo convencional o vegetativo (separación de pseudobulbos) es muy lento, razón por la cual se siguen depredando poblaciones naturales, lo cual está provocando su desaparición, que puede llegar a un punto irreversible como la extinción (Hágsater *et al.*, 2005; Hágsater *et al.*, 2015). Las *Laelias* presentan dificultades para su propagación de forma natural y poco reclutamiento de nuevos individuos, sumando a esto el largo periodo que requieren para su propagación. Estas plantas producen flores que pueden tardar largo tiempo para desarrollarse, además, sus semillas son muy pequeñas y poseen escasa reserva de nutrientes para germinar por lo que dependen de hongos micorrízicos y muchas de las características únicas que las distinguen están asociadas con el hongo que las coloniza (Arditti y Ghani, 2000; Otero *et al.*, 2002; Hágsater *et al.*, 2015). Por ejemplo *L. speciosa*, una plántula necesita un promedio de 16 a 19 años para florecer por primera vez, aunque este periodo juvenil puede excederse en un total entre 9 y 32 años, y viven hasta 56 años o más. No obstante es posible disminuir este tiempo e incrementar las poblaciones, una alternativa prometedora para la resolución de estos problemas es la aplicación de técnicas de propagación y mejoramiento derivadas de la Biotecnología Vegetal como lo es el cultivo *in vitro* (Cortez, 2006; Domínguez *et al.*, 2008).

Las técnicas de cultivo *in vitro* son hoy en día un elemento fundamental en los trabajos de conservación de especies amenazadas y pueden ser aplicadas tanto para los programas *ex situ* como a los desarrollados *in situ*. Las plantas producidas *in vitro* pueden ser utilizadas en proyectos de introducción de poblaciones silvestres. La obtención de especímenes mediante cultivo de tejidos con la finalidad de conservarlos a largo plazo en colecciones *in vitro* es de vital importancia para aquellas especies que por sus especiales características no pueden ser mantenidas en bancos de semillas de tipo convencional. La producción de plántulas *in vitro* de especies amenazadas facilita su envío a otras instituciones de diferentes países, porque cumplen la legislación fitosanitaria, producidas en condiciones de laboratorio, libres de patógenos e insectos, dado su crecimiento y desarrollo en condiciones asépticas estas especies puedan ser distribuidas a diferentes jardines botánicos con la finalidad de conservarlas bajo condiciones *ex situ* (Fay y Clemente, 1997; Hágsater *et al.*, 2015).

2.8 Cultivo de Tejidos Vegetales.

El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) es la ciencia del crecimiento de células vegetales, tejidos u órganos, aislados de una planta madre, en medio artificial con condiciones controladas y libres de microorganismos. Se basa en el principio de totipotencia, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Fertl y Paul, 2000; George *et al.*, 2008).

El concepto original de cultivo de tejidos vegetales se ha extendido modernamente para abarcar tanto el cultivo aséptico de tejidos como el de células y órganos. Las técnicas de cultivos asépticos han contribuido a mejorar el entendimiento de los eventos de la diferenciación celular, a un aprovechamiento de tales eventos en la explotación más eficiente de las plantas. En este último aspecto vale la pena mencionar los siguientes usos de las técnicas del cultivo *in vitro*: a) mejoramiento genético; b) obtención de plantas libres de virus y otros patógenos; c) conservación de germoplasma; y (d) micropropagación (Villalobos y Thorpe, 1991).

2.8.1 Micropropagación.

La micropropagación es sin duda la más extendida de las aplicaciones prácticas en la ciencia del cultivo de tejidos vegetales. En algunas especies, ésta metodología ha mostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación; las más importantes son:

- ✓ Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo.
- ✓ Reducción del tiempo de multiplicación.
- ✓ Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en tiempos económicamente costeados.
- ✓ Mayor control sobre la sanidad del material que se propaga.
- ✓ Facilidad para transportar el material *in vitro* de un país a otro, con menos restricciones aduaneras.
- ✓ Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual sólo existan pocos individuos.

El proceso se divide en cinco etapas cada una con puntos esenciales de los que dependerá un proceso eficiente de regeneración *in vitro* (George y Sherrington, 1984; Villalobos y Thorpe, 1991; George *et al.*, 2008).

- ✓ Etapa 0. Selección de la planta madre.

En el proceso de micropropagación se recomienda una cuidadosa selección del material, la planta madre seleccionada debe ser un individuo que represente las características de la especie a cultivar y, además de no poseer síntomas de enfermedad o senescencia en aquellas que son iteróparas. Previo a la micropropagación pueden aplicarse tratamientos en contra de plagas y microorganismos nocivos (George *et al.*, 2008). Es importante la edad fisiológica del explante, en los meristemas

apicales o yemas axilares de brotes jóvenes suelen responder mejor que aquellos que proceden de otras partes más maduras de la planta (George, 1993).

✓ Etapa I. Establecimiento aséptico de los cultivos.

Una vez seleccionado el mejor explante, se requiere desinfectarlo superficialmente; la razón: en el medio de cultivo pueden crecer microorganismos, principalmente bacterias y hongos, que competirán ventajosamente con el explante, empleando diferentes compuestos como: las soluciones de hipoclorito de sodio y de calcio, el peróxido de hidrógeno, el nitrato de plata, el cloro comercial, alcohol a diferentes porcentajes, entre otros. La selección y concentración de los desinfectantes y el tiempo de desinfección determinado, por las características del explante (Villalobos y Thorpe, 1991).

El éxito en esta etapa requiere, en primer lugar, que los explantes sean transferidos al ambiente, libres de contaminantes microbianos; y debe ser seguido por algún tipo de crecimiento (por ejemplo, formación de brote ó callo).

Después de un corto período de incubación, se descarta cualquier recipiente que se haya encontrado con explantes o medio contaminado. La etapa I se consideraría satisfactoria si un número adecuado de explantes ha sobrevivido sin contaminación (George *et al.*, 2008).

✓ Etapa II. Multiplicación.

La finalidad de esta etapa es producir nuevos brotes o propágulos de plantas que, al ser individualizados, sean capaces de formar plantas completas, pueden cultivarse de nuevo (subcultivos) para aumentar su número, la multiplicación puede producirse a partir de brotes axilares o adventicios recién adquiridos, embriones somáticos u órganos (George *et al.*, 2008).

✓ Etapa III. Elongación y enraizamiento.

Algunas especies forman raíces adventicias en los brotes durante el curso del cultivo, pero usualmente es necesario adoptar un procedimiento de enraizamiento separado usando medios especiales de enraizamiento en los brotes propagados *in vitro* mediante un trasplante a un medio de cultivo con menos concentración de sales. El medio de Murashige y Skoog (1962), por ejemplo, diluido al 50 % ha dado resultados positivos en enraizamiento. Asimismo se requiere cambiar el balance hormonal, esto es, disminuir las citocininas y aumentar las auxinas exógenas, algunas veces la eliminación de las citocininas exógenas ha sido suficiente estímulo para la diferenciación del sistema radical (Villalobos y Thorpe, 1991; George *et al.*, 2008).

✓ Etapa 4. Establecimiento *ex vitro*.

La aclimatización implica que el hombre ha intervenido y dirigido el proceso de adaptación. En general es el proceso de establecimiento en invernadero o campo de las plantas que provienen de condiciones *in vitro* (Lewandowski, 1991).

El proceso de aclimatización más empleado es el del descenso gradual de la humedad relativa, el cual permite a las plantas desarrollar mecanismos de protección a las nuevas condiciones

ambientales. Además de ser el procedimiento más rápido, menos costoso y más práctico con el que generalmente se obtienen buenos resultados, éste puede hacer uso de bolsas de plástico sobre la maceta, túneles de PVC, láminas de plástico transparente que cubran las plantas trasplantadas a invernadero o cámaras de crecimiento de ambiente controlado o semicontrolado (Velázquez, 1994).

Si no se lleva a cabo con cuidado la transferencia puede dar lugar a una pérdida significativa de material propagado. Hay dos razones principales:

- ✓ Los brotes desarrollados *in vitro* se han producido en la alta humedad y poca intensidad de la luz. Esto da como resultado que haya menos cera o cera epicuticular foliar con una composición química alterada. En algunas plantas, los estomas de hojas producidas *in vitro* también pueden ser atípicas e incapaces de cierre completo bajo condiciones de baja humedad relativa. Por lo tanto, las plantas cultivadas *in vitro* pierden agua rápidamente cuando se mueven a condiciones externas.
- ✓ Cuando se suministran con sacarosa (o algún otro carbohidrato) y se mantienen en condiciones de poca luz, las plántulas micropropagadas no dependen totalmente de su propia fotosíntesis (son mixotróficas). Un estímulo es necesario para que puedan ser capaces de producir sus propias necesidades de carbono y nitrógeno reducido (que sean capaces de alimentarse a sí mismos—autótrofo) el cambio sólo ocurre después de que las plantas hayan pasado un período de varios días *ex vitro* (George *et al.*, 2008).

2.8.2 Vías de regeneración *in vitro*.

George y Sherrington (1984), mencionaron que existen dos vías diferentes para lograr la regeneración de plantas *in vitro*: la organogénesis y la embriogénesis somática, éstas ocurren de manera directa a partir del explante inicial o indirectamente mediante la formación de callo que es un tejido parenquimatoso, indiferenciado, sin estructura, y posteriormente se puede diferenciar hacia una estructura organizada. Ambas vías pueden ocurrir en una misma especie o en diferentes partes de la planta. Los reguladores de crecimiento vegetal juegan un papel muy importante en estos procesos (Thorpe, 1998).

2.8.2.1 Organogénesis.

Órganos tales como brotes, hojas y flores pueden con frecuencia ser inducidos a formas adventicias sobre tejidos de plantas cultivadas; la creación de nuevas formas y organización, es denominada morfogénesis u organogénesis. Muchos de estos órganos tienen la capacidad de originar una nueva planta después de ser inducidos a elongarse y formar raíces. La formación de plantas a través de la organogénesis se lleva a cabo por dos vías, la vía directa y la indirecta (George y Sherrington, 1984; George y Debergh, 2008). Pueden formarse órganos en la superficie de los explantes (organogénesis directa) o en una fase intermedia del callo (organogénesis indirecta) (Donnelly y Vidaver, 1988).

- ✓ Organogénesis directa: Consiste en la formación de nuevos órganos adventicios en los explantes cultivados. Los tejidos somáticos maduros de algunas plantas superiores son capaces, bajo ciertas condiciones, de generar plantas adventicias sin que haya la necesidad de que el explante pase por fase de callo (George y Sherrington, 1984).
- ✓ Organogénesis indirecta: Cuando el medio de cultivo y los RCV favorecen una rápida proliferación de células y la formación de callo a partir de un explante, para su posterior diferenciación en brotes, que tras individualizarse puede consolidarse como plantas completas. Los brotes generados por esta vía se forman cuando, el callo, las células experimentan un proceso de redeterminación a través de las constantes divisiones mitóticas, por lo que llegan a un estado en donde adquieren competencia organogénica, constituyendo estructuras unipolares que al desarrollarse pueden dar origen a un nuevo órgano o a una planta. Lo que promueve esta vía regenerativa son altas concentraciones de citocininas (George y Sherrington, 1984; George y Debergh, 2008).

2.8.2.2 Embriogénesis somática.

Como embriones somáticos, asexuales o adventicios se han definido los iniciados a partir de células que no son producto de la unión de gametos. Son estructuras bipolares con un eje radical- apical y no poseen conexión vascular con el tejido materno: las estructuras bipolares deben ser también capaces de crecer y formar plantas normales. Los embriones pueden formarse directamente en el explante primario, o indirectamente de las células cultivadas en suspensión o en un medio semisólido (Roca y Mroginski, 1991).

- ✓ Embriogénesis somática directa: La embriogénesis somática directa es la formación de embriones somáticos o tejido embriogénico directamente del explante sin la formación de una fase intermedia de callo (Gamborg *et al.*, 1968).
- ✓ Embriogénesis somática indirecta: Los embriones somáticos o embrioides, pueden también ser producidos indirectamente en células desorganizadas. Los explantes que fueron embriogénicamente predeterminados, pueden dar lugar a callo y a partir de ahí, a embriones somáticos como tales (George y Sherrington, 1984).

2.8.2.3 Activación de yemas preformadas.

Existe una tercera vía de regeneración en donde si las condiciones *in vitro* estimulan el desarrollo de las yemas axilares, permiten la formación de una planta por cada yema. La eficiencia de este sistema estriba en que el número de plantas obtenidas está determinado por el número de yemas axilares existentes en el explante, esta vía de regeneración presenta la ventaja de que los individuos regenerados muestran gran estabilidad genética, sin embargo es necesario promover la formación de raíces en los brotes regenerados (Villalobos y Thorpe, 1991).

2.8.3 Factores que influyen en la micropropagación.

2.8.3.1 Explantes.

El explante es una parte de un tejido o de un órgano que se aísla del resto de la planta con fines de cultivo. El explante debe responder eficientemente bajo las condiciones *in vitro*, es importante considerar el hecho de que el aislamiento de un tejido u órgano del resto de la planta provoca un estado de estrés que altera su metabolismo celular y, en forma importante, su balance hormonal, un buen explante es aquel cuyas células sobreviven, en una alta proporción, a la descomposición antes señalada, y que luego responde eficientemente a las condiciones *in vitro*. Si las plantas que se van a micropropagar tienen reproducción por semillas, las partes embrionales o de la plántula son fuentes más comunes de explantes; en el caso de especies propagadas vegetativamente, los brotes jóvenes y los ápices meristemáticos han sido generalmente la fuente de los explantes. Se ha observado que la edad fisiológica del explante tiene gran influencia en la morfogénesis, mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar, mejor será la respuesta *in vitro* (Villalobos y Thorpe, 1991).

2.8.3.2 Medio de cultivo.

Los medios de cultivo son combinaciones de sustancias químicas que los investigadores han descrito después de numerosos experimentos y que permiten que las plantas crezcan y se multipliquen *in vitro*. Los ingredientes de un medio de cultivo vegetal pueden clasificarse: 1) sales inorgánicas (minerales: macronutrientes y micronutrientes), 2) compuestos orgánicos, 3) preparaciones naturales complejas y 4) materiales inertes (Abdelhour y Vicent, 1994).

De acuerdo con Gamborg *et al.* (1976), el éxito en el CTV depende de la selección del medio de cultivo, incluyendo su composición química y su forma física. Una vez definido el objetivo perseguido con el cultivo *in vitro* de un determinado explante, es necesario elegir un medio apropiado de cultivo, en el cual hay que considerar no sólo sus componentes sino su preparación; existen innumerables formulaciones cada una de las cuales contiene entre 15 y 35 compuestos químicos que suministran: carbono, nutrimentos minerales, vitaminas, agente gelificante (en caso de medios semisólidos), sustancias reguladoras del crecimiento, y otros compuestos (Roca y Mroginski, 1991).

2.8.3.3 Oxidación en CTV.

La oxidación u oscurecimiento de tejidos cultivados *in vitro*, se puede definir como la oxidación, por radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como, la oxidación de compuestos fenólicos catalizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular. Cuando se extrae un explante de la planta madre, la primera respuesta del tejido es la exudación de compuestos fenólicos en el sitio de corte, provocando un severo oscurecimiento del tejido y del medio circundante, lo que limita la respuesta del explante, provocando la muerte del mismo. Para mantener la capacidad de regeneración de los explantes, es importante la aplicación de diferentes estrategias, que eviten la acción de exudados fenólicos, por ejemplo:

- ✓ Uso de explantes en estado juvenil o de material en crecimiento activo.
- ✓ Crecimiento del explante a baja luminosidad o en oscuridad.
- ✓ Crecimiento del explante en una temperatura baja.
- ✓ Subcultivos frecuentes.
- ✓ Cultivo en medio líquido.
- ✓ Uso de adsorbentes, en la preparación del explante para su cultivo o en el medio de cultivo: (Polivinil pirrolidona (PVP), polivinil polipirrolidona (PVPP), Carbón activado (CA)).
- ✓ Uso de antioxidantes en la preparación del explante para su cultivo o en el medio de cultivo: (Ácido cítrico y ácido ascórbico).
- ✓ Elección del medio de cultivo.
- ✓ Elección de los reguladores del crecimiento.
- ✓ Cambio del potencial osmótico del medio de cultivo.
- ✓ pH del medio de cultivo bajo.
- ✓ Inactivación de enzimas (Nahuat *et al.*, 2001; Álvaro, 2009).

2.8.3.4 Uso de Carbón Activado (CA) en el medio de cultivo.

Mediante la adición de CA al medio de cultivo es posible remover compuestos fenólicos. Evitando o disminuyendo el deterioro del explante. El carbón activado adsorbe sustancias químicas en general, limitando así su intervención con el tejido cultivado. Con respecto a las auxinas y citocininas, se cree que el carbón activado las retiene liberándolas progresivamente en el medio favoreciendo así la embriogénesis somática. Las concentraciones empleadas que se observan en la literatura varían entre 0.5 y 10 g/L, siendo más frecuentes las dosis de 2.0 y 3.0 g/L (Abdelnour y Vicent, 1994; Álvaro 2009).

2.8.4 Reguladores de crecimiento vegetal (RCV).

Son compuestos orgánicos sintetizados por la propia planta, tienen diferentes estructuras químicas y funciones, sin embargo, presentan algunas características comunes éstas son: producidas en pequeñas cantidades, activas a muy bajas concentraciones (alteran el crecimiento o los patrones de desarrollo vegetal) y sintetizadas comúnmente en una parte de la planta y traslocadas al sitio de acción. Es por ello que el manejo de los tipos, concentraciones y combinaciones de estos compuestos pueden obtenerse como respuesta la formación de tejido como: las células callosas, brotes, embriones somáticos y raíces (Arditti, 1992; Pérez *et al.*, 1999).

Algunos productos químicos que ocurren naturalmente dentro de los tejidos vegetales (es decir, endógenos), tienen un papel regulador, en el crecimiento y desarrollo. Algunas de las sustancias naturales de crecimiento se preparan sintéticamente o mediante procesos de fermentación y pueden adquirirse a proveedores químicos. Cuando se han añadido estos productos químicos a los medios de cultivo de tejidos vegetales, se denominan Reguladores de Crecimiento Vegetal, para indicar el hecho de que se han aplicado desde fuera de los tejidos (es decir exógenamente). La clasificación principal de los RCV se realiza en cinco grupos principales dependiendo de su estructura química y su efecto fisiológico que son: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno (Pérez *et al.*, 1999; George *et al.*, 2008). Las auxinas y las citocininas son por mucho los componentes más importantes para regular el crecimiento y morfogénesis de los tejidos vegetales y de los cultivos de órganos, por lo tanto son los más utilizados en el cultivo *in vitro*; en estas clases se han descubierto reguladores sintéticos con la misma actividad biológica que igualan o exceden a las sustancias naturales. Actualmente no existen opciones sintéticas para las giberelinas y el ácido abscísico (George *et al.*, 2008).

2.8.4.1 Auxinas.

La palabra auxina tiene un origen griego: *auxein* significa agrandar o crecer. A nivel celular, las auxinas controlan procesos básicos tales como la división celular y la elongación celular. Puesto que son capaces de iniciar la división celular, están implicados en la formación de meristemas que dan origen a tejido no organizado y órganos definidos. En los tejidos organizados, las auxinas participan en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad y en las plantas enteras su efecto más marcado es el mantenimiento de la dominancia apical y la mediación de tropismos (formación de raíces) (George *et al.*, 2008). En algunos sistemas, la alta concentración de auxinas exógenas conduce a una síntesis mayor de etileno, el cual inhibe crecimiento pero, por otro lado, puede inducir a una embriogénesis somática (Gaba, 2005).

Las auxinas están implicadas en la elongación y división celular y junto con las citocininas estimulan la diferenciación de los tejidos vasculares (xilema y floema) (Tabla 4) (Davies, 2010).

Tabla 4 Ejemplos de diferentes auxinas naturales y sintéticas en el CTV.
(Donnelly y Vidaver, 1988; Contreras, 2016).

Nombre	Nombre común	PM	Concentración usada (mg/L)	Solvente	Esterilización	Fuente
Ácido indolacético	AIA IAA	175.2	0.01-3	KOH (ca. 1 M) NaOH (ca. 1 M)	Autoclave Filtración	Natural
Ácido naftalenacético	ANA NAA	186.2	0.10-10	KOH (ca. 1 M) NaOH (ca. 1 M)	Autoclave	Sintética
Ácido indolbutírico	AIB IBA	203.2	0.10-10	KOH (ca. 1 M) NaOH (ca. 1 M)	Autoclave Filtración	Natural
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	2,4-D	221.0	0.01-5	KOH (ca. 1 M) NaOH (ca. 1 M) Etanol	Autoclave	Sintética
Ácido amino-tricloropicolínico	Picloram	241.5	0.10-10	DMSO	Autoclave	Sintética

2.8.4.2 Citocininas.

Este grupo de hormonas de las plantas fue descubierto en 1955 cuando investigadores de la Universidad de Wisconsin aislaron kinetina, una citocinina que no existe en la naturaleza. Las citocininas se encuentran en todas las plantas con flor como sustancias libres o como parte del RNA. Los embriones y frutos jóvenes son especialmente ricos en citocininas, también han sido aisladas a partir de raíces y sus exudados, hojas, flores y otras partes de la planta (Arditti, 1992).

Las citocininas sintéticas son la 6-benciladenina (BA) (también conocida como 6-bencilaminopurina (BAP)) y kinetina (6-furfurilaminopurina). Existen algunos herbicidas sintéticos de la fenilurea que actúan como citocininas en bajas concentraciones, la 1,3 Difenilurea y el Tiazurón (TDZ) (N-fenil-N¹-1, 2, 3,-tiazolil-5urea) (Gaba, 2005).

Las citocininas en presencia de auxinas inducen la división celular. Tienen un amplio espectro regulatorio, ya que pueden retardar la senescencia, la expansión de las hojas y promueven la formación de brotes principalmente (Tabla 5) (Slater *et al.*, 2003; Davies, 2010).

Tabla 5 Ejemplos de diferentes citocininas naturales y sintéticas utilizadas en el CTV.
(Donnelly y Vidaver, 1988; Contreras, 2016).

Nombre	Nombre común	PM	Concentración usada (mg/L)	Solvente	Esterilización	Fuente
Benciladenina	BA BAP	225.3	0.1-10	HCl (ca. 1 M) NaOH 1N	Autoclave Filtración	Sintética
Kinetina	KIN	215.2	0.1-10	HCl (ca. 1 M) NaOH 1N	Autoclave Filtración	Sintética
Isopentiladenina	2iP	203.2	1.0-30	HCl (ca. 1 M) NaOH 1N	Autoclave Filtración	Natural
Feniltiazol urea	Tidiazurón TDZ	220.2	0.001-0.1	DMSO	Autoclave Filtración	Sintética

2.8.4.3 Otros RCV en el CTV.

- ✓ **Ácido abscísico:** El ácido abscísico (ABA) es otra sustancia de crecimiento naturalmente presente. Se sabe desde hace tiempo que la deshidratación del tejido vegetal conduce a una biosíntesis incrementada de ABA. Sin embargo, está bien establecido que una serie de otros factores ambientales, bajas y altas temperaturas, salinidad e inundaciones también puede producir el mismo efecto (George *et al.*, 2008).
- ✓ **Giberelinas:** Las giberelinas están involucradas en una amplia gama de respuestas de desarrollo. Estos incluyen la elongación en tallos y hojas, debido en parte a la activación del meristemo intercalar. Otro papel importante de las giberelinas es la inducción de enzimas hidrolíticas tales como α -amilasa y proteasa en las semillas de gramíneas y cereales. Además promueven la germinación de las semillas, la fijación de rosetas, la determinación del sexo, el desarrollo de las frutas y el control de la maduración. Cuando se añade GA₃ a los medios de cultivo, a menudo produce efectos, que son de naturaleza similar a las auxinas. Las concentraciones elevadas de GA₃ (por ejemplo, superiores a aproximadamente 5 μ M, 1-8 mg/L) inducen el crecimiento de células indiferenciadas (callo) (George *et al.*, 2008).
- ✓ **Etileno:** El etileno es un compuesto gaseoso, es producido por todos los tejidos vegetales vivos y regula su crecimiento. Está implicado en la maduración de los frutos, la senescencia y la ausencia de hojas, pero también tiene muchas otras funciones. Es notable que, dependiendo de la especie o de los tejidos implicados, el etileno puede tener efectos marcadamente diferentes en el desarrollo. Por ejemplo, mientras que el gas inhibe generalmente el crecimiento de brotes dicotiledóneos (por ejemplo, guisantes), promueve el crecimiento en una serie de hidrófitas. Igualmente, a la luz, el etileno puede promover realmente el crecimiento de las plántulas de *Arabidopsis* (Tabla 6) (George *et al.*, 2008).

Tabla 6 Ejemplos de otros RCV y sustancias afines utilizadas en el CTV.
(Donnelly y Vidaver, 1988; Contreras, 2016).

Nombre	Nombre común	PM	Concentración usada (mg/L)	Solvente	Esterilización	Fuente
Ácido abscísico	ABA	264.3	0.1-10	KOH (ca. 1 M) NaOH 1N	Autoclave Filtración	Natural
Ácido 3,6-dicloroanísico	Dicamba	221.0	0.1-10	Etanol	Filtración	Sintética
Ácido giberélico.	GA ₃	346.4	0.01-5	KOH (ca. 1 M) NaOH (ca. 1 M) Etanol	Filtración	Natural
Ácido jasmónico		210.3	0.001-100	Etanol	Filtración	Natural
Fosfometil glicina	Glifosfato	169.1		NaOH 1N	Filtración	Sintética

2.8.5 Usos y aplicaciones del CTV.

En los últimos años, el CTV ha adquirido una importancia considerable en la investigación básica, y su uso se ha expandido rápidamente en la biotecnología aplicada. El avance alcanzado por las ciencias biológicas ha permitido en los últimos años el estudio detallado de las plantas tanto a nivel celular como molecular, y en condiciones de laboratorio es posible actualmente reproducir todos los factores que puedan incidir en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Se ha demostrado su gran utilidad para propagar, estudiar, conservar especies y la producción masiva de plantas de todo tipo: forestales, ornamentales, alimenticias, medicinales, frutales, hortícolas y principalmente aquellas que presentan problemas en su conservación como cactáceas y orquídeas, entre muchas más (Tabla 7) (Sharry *et al.*, 2015).

Tabla 7 Propagación por medio del CTV en diferentes especies vegetales.

Abreviaturas- AIA: Ácido indol-3-acético; AIB: Ácido indol-3-butírico; ANA: Ácido α -naftalenacético; BA: N6-benciladenina; CA: Carbón activado; KIN: Kinetina MS: Medio de cultivo Murashige y Skoog; MS50/100: MS con 50 % de sales inorgánicas y 100 % de compuestos orgánicos; MS50: MS al 50 % de todos sus componentes; P-Ca: Prohexadiona de calcio; RCV: Reguladores de crecimiento vegetal; spp: especies; ssp: subespecie; TDZ: Tiazurón; ZEA: Zeatina; 2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético; 2iP: 6-(γ , γ -dimetilalilamino) purina.

Especie	Nombre común	Uso	Medio de cultivo y RCV	Referencia
<i>Agave tequilana</i>	Agave azul Agave tequilero	Bebida	MS+ AIB y KIN	Angeles <i>et al.</i> , 2012
<i>Bougainvillea glabra</i>	Buganvilia	Ornamental	MS+ ANA, 2,4-D y BA	Rodríguez, 2016
<i>Coffea arabica</i>	Café	Bebida, Alimento	MS50/100+ ANA y BA	Lozano, 2014
<i>Fragaria ssp.</i>	Fresa	Alimento	MS+ TDZ y AIB	Pillco y Quezada, 2017
<i>Musa ssp.</i>	Plátano o banano	Alimento	MS50+ BA y AIA	Bermúdez <i>et al.</i> , 2016
<i>Nicotiana tabacum</i>	Tabaco	Cigarrillos	MS+ ANA, BAP, ZEA, KIN y 2iP	Medina y González, 2014
<i>Opuntia ficus-indica</i>	Nopal	Alimento	MS50+ BA y P- Ca	Pacheco, 2015
<i>Pinguicula moranensis</i>	Violeta de Barranca	Ornamental	MS+ BA, ANA y 2,4-D	Pérez <i>et al.</i> , 2017
<i>Stevia rebaudian</i>	Stevia	Endulzante sin calorías.	MA+ BA y AIB	Martínez <i>et al.</i> , 2016
<i>Turbinicarpus spp.</i>	Cactus	Farmacología	MS50+CA, BA, 2ip, AIB y AIA	De la Rosa <i>et al.</i> , 2012

2.8.6 El CTV en la familia Orchidaceae.

Se reporta que las orquídeas fueron las primeras plantas propagadas *in vitro* a partir de la siembra de semillas, de manera simbiótica en Francia 1900 por Noël Bernard y asimbióticamente por Lewis Knudson en los Estados Unidos de América en 1921 (Sánchez y Jiménez, 2010). Knudson (1922), estableció un método completamente controlado, estandarizado y simple para la germinación de semillas de orquídea. Él realizó trabajos que mostraron que los azúcares tenían una influencia favorable sobre el crecimiento de las plantas, por lo que dedujo que la semilla de orquídea podría requerir la presencia de algún azúcar para germinar. Por lo que descubrió que la semilla germinaba fácilmente sin la presencia del hongo cuando era sembrada sobre agar al cual se le habían agregado minerales y carbohidratos. Este método fue llamado asimbiótico (Sierra, 2006).

La micropropagación de orquídeas, de forma moderna comienza en 1949, con un nuevo (cultivo de tejidos o *in vitro*) práctico método de propagación vegetativa (clonal) de *Phalaenopsis* (orquídea) que fue desarrollado en la Universidad de Cornell. El medio nutritivo utilizado para este cultivo fue Knudson C (KC), formulado para la germinación asimbiótica de semillas de orquídeas por Lewis Knudson, profesor de Fisiología de Plantas de la Universidad de Cornell (Arditti, 1996).

La germinación *in vitro* utilizando semillas, es uno de los componentes más importantes para la conservación y propagación de orquídeas, porque permite mantener la viabilidad genética de las poblaciones naturales y no solamente clones (Pritchard, 1989). Varios factores son determinantes para lograr el establecimiento de semillas *in vitro* de orquídea, como el estado de madurez de la cápsula, los componentes del medio de cultivo y las condiciones de cultivo como luz y temperatura (Arditti, 1982).

En los últimos años se han propagado *in vitro*, diferentes géneros de orquídeas, principalmente por su valor ornamental por ejemplo, el género *Cattleya* (Torres y Mogollón, 2005; Salazar, 2012) y *Phalaenopsis* (Hempfling y Preil, 2005; Tirado *et al.*, 2005). Por su alto valor económico para alimentos y aromatizante la *Vanilla planifolia* (Bello *et al.*, 2015). La propagación *in vitro* también se ha realizado para la conservación de orquídeas, algunos ejemplos son: *Comparettia falcata* (Karol *et al.*, 2015), *Barkeria whartonia* y *Barkeria scandens* (Villafuerte, 2013), *Habenaria novemfida* (Carmona, 2016), *Phaphiopedilum rothschildianum* (Yih y Mohd, 2011) y *Prosthechea citrina* (Cazares *et al.*, 2016). Para lograr la germinación y propagación *in vitro* se utilizaron diferentes medios de cultivo principalmente el medio MS y KC, RCV, auxinas (ANA) y citocininas (BA, KIN y TDZ), diferentes tipos de explantes (cápsulas, semillas, protocormos, PLBs, brotes, tallos y hojas). Dando como resultado la germinación, embriogénesis somática directa e indirecta, organogénesis directa y crecimiento (Tabla 8).

Tabla 8 El CTV en diferentes especies de la familia Orchidaceae.

Abreviaturas- ABA: Ácido abscísico; AC: Agua de coco; ANA: Ácido α -naftalenacético; BA: N6-benciladenina; KC: Medio Knudson C; ESD: Embriogénesis somática directa; ESI: Embriogénesis somática indirecta; KIN: Kinetina; MS: Medio de cultivo Murashige y Skoog; MS50: MS al 50 % de todos sus componentes; OD: Organogénesis directa; PLBs: Cuerpos parecidos a protocormos; RCV: Reguladores de crecimiento vegetal; TDZ: Tidiázurón.

Especie	Explante utilizado	Medio de cultivo	RCV	Respuesta	Referencia
<i>Barkeria whartonia</i>	Semillas	MS	Ninguno	90 % Germinación.	Villafuerte, 2013.
	Protocormos	MS	ANA(1 mg/L)+ BA (1 mg/L)	48.45PLBs/Explante- ESD	
<i>Barkeria scandens</i>	Hoja	MS	ANA(0.5 mg/L)+ BA(2 mg/L)	18.1PLBs/Explante- ESD	
	Tallo	MS	ANA(0.5 mg/L)+ BA(1 mg/L)	22PLBs/Explante- ESD	
<i>Cattleya mossiae</i>	Brotes	MS	TDZ (1.3 μ M)	10Brotes/Explante OD	Torres y Mogollón, 2000.
<i>Cattleya mendelii</i>	Cápsula	MS+ AC (20 %)	Ninguno	93 % Germinación	Salazar, 2012
<i>Comparettia falcata</i>	Semillas	KC	Ninguno	70 % Germinación.	Karol <i>et al.</i> , 2015.
<i>Habenaria novemfida</i>	Semillas	MS	Ninguno	98 % Germinación	Carmona, 2016.
<i>Phaphiopedilum rothschildianum</i>	PLBs	MS	KIN (4,0 μ M)	4.1PLBs/Explante-ESI	Yih y Mohd, 2011.
<i>Phalaenopsis sp.</i>	Protocormo	MS50 + Sacarosa (1.5 %)	TDZ 5 mg/L	8PLBs/Explante-ESD	Tirado <i>et al.</i> , 2005
<i>Phalaenopsis sp.</i>	Brotes 1-3 cm	MS50	TDZ (0.5 mg/L)	25.4Brotes/Explante- OD	Hempfling y Preil, 2005
<i>Prosthechea citrina</i>	Protocormos	MS	ANA (0.15 mg/L) + BA (1.5 mg/L)	6.75Brotes/Explante- OD	Cazares <i>et al.</i> , 2016.
<i>Vanilla planifolia</i>	Brotes 0.5 cm	MS	ABA (3 mg/L)	Crecimiento 1.3 \pm 0.12 longitud- OD	Bello <i>et al.</i> , 2015.

2.8.7 El CTV en el género *Laelia*.

Se han reportado trabajos de la propagación *in vitro* de diferentes especies del género *Laelia* (Tabla 9) tales como: *L. albida*, *L. anceps*, *L. anceps* sp. *Dawsonii*, *L.anceps* subsp. *anceps*, *L. autumnalis*, *L. eyermaniana*, *L. gouldiana*, *L. halbingeriana*, *L. rubescens*, *L. speciosa* y *L. superbiens*.

Se han realizado pruebas de viabilidad de semillas con TTZ en las especies de *L. albida* (Ortiz, 2001; Santos, 2002) y *L. speciosa* (Velázquez, 1997; Buentello y Sánchez, 1998; Cortez, 2006).

La germinación asimbiótica de diferentes *Laelias* se ha establecido a partir de semillas maduras y cápsulas cerradas (inmaduras) en medio de cultivo MS en: *L. albida* (Ávila y Salgado, 2006), *L. anceps* sp. *Dawsonii* (Lee *et al.*, 2007), *L. anceps* subsp. *anceps* (Romero *et al.*, 2007), *L. autumnalis* (Ávila y Salgado, 2006; Sierra, 2006; Vergara *et al.*, 2010), *L. eyermaniana* (Francisco *et al.*, 2011), *L. rubescens* (Potisek *et al.*, 1996; Nahuat, 2001), *L. speciosa* (Velázquez, 1997; Buentello y Sánchez, 1998; Cortez, 2006; Ávila y Salgado, 2006; Ávila *et al.*, 2009; Aguilar y López, 2013) y *L. superbiens* (Ordoñez, 2015).

En la germinación asimbiótica con medio KC se ha utilizado en semillas maduras de *L. albida* (Ortiz, 2002; Santos, 2002; Santos *et al.*, 2005) y *L. speciosa* (Aguilar y López, 2013).

En la regeneración se han utilizado diferentes tipos de explantes como: brotes, callo, PLBs ó embriones somáticos, segmentos de hoja, segmentos de raíz, segmentos de tallo, plántulas y protocormos. Los RCV utilizados son: auxinas (ANA; AIA; AIB; 2,4-D), citocininas (BA; TDZ) y giberelinas (GA₃) en diferentes concentraciones, obteniendo respuestas morfogénicas: organogénesis y embriogénesis somática.

Para la aclimatización de especies del género *Laelia* se usaron plantas mayores de 3 cm, aclimatizadas en diferentes sustratos: Agrolita o decalita, corteza de encino, corteza de pino, carbón vegetal, sphagnum, peat moss, tepezil y tezontle (Tabla 9).

Tabla 9 Micropropagación de diferentes especies del género *Laelia*.

Abreviaturas-AIA: Ácido indol-3-acético; AIB: Ácido indol-3-butírico; ANA: Ácido α -naftalenacético; BA: N6-benciladenina; CA: Carbón activado; cm: centímetros; ESI: Embriogénesis somática indirecta; FP: Fibra de palma; GA3: Ácido giberélico; KC SIGMA®: Medio KC comercial; KC: Medio Knudson C; NE: No específica; mg/L: miligramos por litro; ml/L mililitros por litro; MS SIGMA®: Medio MS comercial; MS: Medio Murashige y Skoog; MS50: Medio Murashige y Skoog al 50 % de sus componentes; OD: Organogénesis directa; OI: Organogénesis indirecta; Peters®: Fertilizante comercial; PLBs: Cuerpos parecidos a protocormos (embriones somáticos); Promix®: Sustrato comercial; Rita®: Reactor de Inmersión Temporal Automático; TDZ: Tiazurón; TTZ: Cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolio; %: Porcentaje.

Especie	Explante	Medio de cultivo, sustrato o TTZ	RCV	Respuesta obtenida.	Referencia
<i>L. rubescens</i>	Cápsula	MS	Ninguno	Germinación 62.5 %	Potisek <i>et al.</i> , 1996
	Plántulas	MS	BA (1 mg/L) + ANA (0.1 mg/L)	Callo 41.5 %	
<i>L. speciosa</i>	Semillas	TTZ	Ninguno	Viabilidad 76 %	Velázquez, 1997
		MS	Ninguno	Germinación 80 %	
		MS SIGMA® + Sacarosa 1, 3 y 5 %	Ninguno	Germinación 100 %	
<i>L. speciosa</i>	Semillas	TTZ	Ninguno	Viabilidad 87 %	Buentello y Sánchez, 1998
		MS + Sacarosa	Ninguno	Germinación 89.3 %	
<i>L. rubescens</i>	Semillas	MS	2,4-D (1 mg/L) + ANA (1 mg/L) + AIA (1 mg/L) + AIB (1 mg/L)	PLBs NE-OD	Nahuat, 2001
			BA, K (0.1, 0.5, 1, 1.5 mg/L)	PLBs NE-OD	
			BA (2 mg/L) + K (2.5 mg/L)	Callo	
	Callo	MS	BA (2 mg/L) + ANA (2 mg/L)	PLBs 403-ESI	
			BA (2 mg/L) + ANA (2 mg/L) + AIA (2 mg/L)	Embriones somáticos 82-ESI	
	PLBs	MS	BA (2 mg/L) + ANA (2 mg/L) + AIA (2 mg/L)	Embriones somáticos 164-ESI	
	PLBs	MS	BA (2 mg/L) + ANA (2 mg/L) + AIA (2 mg/L)	Embriones somáticos 297 y plántulas-ESI	
Plántulas	MS	BA (2 mg/L) + ANA (2 mg/L) + AIA (2 mg/L)	Raíces NE-OD		
<i>L. albida</i>	Semillas	TTZ	Ninguno	Viabilidad 64 %	Ortiz, 2001
		KC SIGMA®	Ninguno	Germinación 1 %	
<i>L. albida</i>	Semillas	TTZ	Ninguno	Viabilidad 90-98 % almacenadas 1 año	Santos, 2002
		KC SIGMA®	Ninguno	Germinación 90 %	
		KC SIGMA® + Pulpa de papa	Ninguno	Desarrollo de plantas-OD	

Continúa Tabla 9 Micropropagación de diferentes especies del género <i>Laelia</i>					
<i>L. albida</i>	Semillas	KC	Ninguno	Germinación 90 %	Santos <i>et al.</i> , 2005
	Protocormos	KC + Pulpa de papa 2 %	Ninguno	Plántulas-OD	
	Brotes	KC + Pulpa de papa 2 %	BA (7.4 µM) (1.6 mg/L)+ANA (10 µM) (1.89 mg/L)	-6PLBs/Explante-OD	
		KC+ Endospermo líquido de coco 10 %	BA (7.4 µM) (1.6 mg/L)+ANA (10 µM)(1.89 mg/L)		
<i>L. albida</i>	Semillas	MS	NE	Germinación 100 %	Ávila y Salgado, 2006.
	Plántulas >3 cm	Tezontle + Corteza de encino (1:1)	Ninguno	Aclimatización >70 %	
<i>L. autumnalis</i>	Semillas	MS	NE	Germinación 100 %	
	Plántulas >3 cm	Tezontle + Corteza de encino (1:1)	Ninguno	Aclimatización >70 %	
<i>L. speciosa.</i>	Cápsula	MS	NE	Germinación 100 %	
	Plántulas >3 cm	Tezontle + Corteza de encino (1:1)	Ninguno	Aclimatización 98 %	
<i>L. autumnalis</i>	Semillas	MS Luz con filtro rojo	Ninguno	Germinación 100 % Plántulas.	Sierra, 2006
	Plántulas 4-5 hojas y raíces	Agrolita + sphagnum (2:1)	Ninguno	Aclimatización 63.33 %	
<i>L. speciosa</i>	Semillas	TTZ	Ninguno	Viabilidad 85.2 %	Cortez, 2006
		MS SIGMA® + Fructosa	Ninguno	Germinación 82 %	
<i>L. anceps</i>	Protocormos	MS	BA (3 mg/L)	50.6 PLBs/Protocormo	Tinoco, 2006
		MS	BA (1 mg/L)	53.3PLBs/Protocormo	
		MS	Ninguno	26.5Brotes/Protocormo	
		MS	BA (1 mg/L) + 2,4-D (0.5 mg/L)	24Brotes/Protocormo	
	Plantas 4.5 cm	Tepezil	Ninguno	Aclimatización 94.81 % supervivencia	
<i>L. anceps sp. Dawsonii</i>	Semillas	MS	ANA (2 mg/L) + BA (2 mg/L) + AIA (2 mg/L)	Callo	Lee <i>et al.</i> , 2007
	Callo 2 mm	MS	Ninguno.	165.2Embriones somáticos/ Total tratamiento-ESI	
<i>L. anceps subsp. anceps</i>	Semillas	MS	Ninguno	Germinación NE	Romero <i>et al.</i> , 2007
	Plántula	MS Sustitución de sales inorgánicas por Peters® 25 %.	Ninguno	Formación de Pseudobulbos 70 %-OD Elongación de plántulas 7 cm-OD	

Continúa Tabla 9 Micropropagación de diferentes especies del género <i>Laelia</i> .					
<i>L. anceps</i> subsp. <i>anceps</i>	Plántulas 1-3 cm	MS +Homo- geinizado de papa (50 g/L).	Ninguno	Elongación 5.36 cm	Castañeda, 2008
		MS	TDZ (2.2 µM) (0.48 mg/L) + ANA (2.7 µM) (0.5 mg/L)	42.1Brotos/Explante-OD	
	Plantas 3- 5 cm	Corteza de pino + Carbón vegetal + Tepezil (1:1:1)	Ninguno	Aclimatización 82.92 %	
<i>L. anceps</i>	Brotos	Promix® al 20 %	Ninguno	Elongación de plántulas >3 cm. Raíces 2 cm.	Sánchez, 2009
		Solución de fibra de coco al 20 %	Ninguno	Elongación de plántulas >3 cm. Raíces 2 cm.-OD	
<i>L. speciosa</i>	Semillas	MS	Ninguno	Germinación 60 %	Ávila <i>et al.</i> , 2009
			BA (0.1 mg)	Germinación 100 %	
	Plántulas 0.3-0.5 cm	MS	GA ₃ (28.87 µM)(10mg) + ANA (2.69 µM) (0.5 mg/L)	Elongación de plántulas -1.60 cm	
			ANA (1.34 µM) (0.25 mg/L)	Raíces -3-OD	
			ANA (2.69 µM) (0.5 mg/L)	3-8PLBs/Explante-OD	
			ANA (5.37 µM) (1 mg/L)	Callo 2.5 cm	
Plántulas >3 cm	Corteza de pino + Decalita + Tezontle (1:1:1)	Ninguno	Aclimatización 42 %		
<i>L. gouldiana</i>	Segmento de hoja 0.5-1 cm	MS50	ANA (0.1 mg/L)	20Brotos/Tratamiento-OD	Gómez, 2009
		MS50	ANA (0.5 mg/L) + BA (1 mg/L)	23Brotos/Tratamiento – OD	
	Ápice de Raíz 0.5-1 cm	MS50	Ninguno	Elongación 11.5 cm	
	Tallo 0.5-1 cm	MS50	Ninguno	32Brotos/Tratamiento-OD	
		MS50	BA (0.5 mg/L)	30Brotos/Tratamiento-OD	
		MS50	ANA (0.1 mg/L)	22PLBs/Tratamiento -OD 88Brotos/Tratamiento – OD	
	Plántulas 5-7 cm	Peat moss + Agrolita (3:1)	Ninguno.	Aclimatización 98.7 %	
<i>L. autumnalis</i>	Semillas	MS	Ninguno	Germinación 100 %	Vergara <i>et al.</i> , 2010
		MS50	Ninguno	Germinación 100 %	

Continúa Tabla 9 Micropropagación de diferentes especies del género <i>Laelia</i> .					
<i>L. speciosa</i>	Segmento foliar 0.2 cm ²	MS	BA (2.5 mg/L)	Callo 1.25 cm	Sarabia <i>et al.</i> , 2010
	Callo 0.5 cm	MS	BA (1 mg/L) + ANA (2.5 mg/L) BA (2.5 mg/L)	11PLBs/Explante.-ESI	
	PLB 0.5 cm	MS	ANA (0.5 mg/L) + GA ₃ (0.1 mg/L)	Plántulas 3 cm-OD	
	Plantas 5 cm	Tezontle + Corteza de encino (1:1)	Ninguno	Aclimatización 77.5 %	
<i>L. eyermaniana</i>	Semillas	MS50 + CA (0.05 %)	Ninguno	Germinación NE PLBs NE-OI	Francisco <i>et al.</i> , 2011
	Plantas 1-3 cm	FP Soyate	Ninguno	Aclimatización 47 %	
<i>L. speciosa</i>	Cápsula	KC	Ninguno	Germinación 100 %	Aguilar y López, 2013
		MS50 + CA (0.1 %)	Ninguno	Germinación 100 %	
<i>L. halbingeriana</i>	Plántulas 2.5 cm	MS	BA (2.22 µM) (0.5 mg/L)	3.93Hojas/Explante	Raya, 2013
		MS	ANA (5.20 µM) (0.1 mg/L)	Promovió el enraizamiento	
	Plántulas 2.5 cm	Corteza de encino	Ninguno	Aclimatización 80 %	
<i>L. superbiens</i>	Semillas	MS + CA (1 g/L)	Ninguno	Germinación 100 %	Ordóñez, 2015
	Plántulas 1-2 cm.	MS + Endospermo líquido de coco (100 ml/L)	Ninguno	8.74Brotos/Explante-OD	
		Rita® MS50 + Endospermo líquido de coco. (100 ml/L)	Ninguno	5.06Brotos/Explante-OD	
		MS	TDZ (4.44 µM) (1 mg/L)	12.1 Brotos/Explante-OD.	
	Plantas 2-8.6 cm	Corteza de Pino + Tepezil + Carbón vegetal (1:1:1).	Ninguno	Aclimatización 78.10 %	

3. Justificación.

Debido a sus flores bellas y vistosas las orquídeas silvestres, han sido objeto de una fuerte presión por parte de los recolectores para ser comercializadas, la extracción ilegal y la destrucción de sus hábitats ha tenido como consecuencia que estén consideradas en peligro de extinción en instrumentos legales nacionales e internacionales como la UICN, CITES y la NOM 059 SEMARNAT.

El género *Laelia* es endémico de México y sus flores tienen gran valor ornamental, religioso y tradicional en la cultura mexicana, tal es el caso de *L. albida* una orquídea que sus flores han sido utilizadas durante siglos como ofrendas en festividades de “Día de muertos”, es conocida comúnmente como “flor de tatanachtle” y “monjita”. Sin embargo la colecta excesiva de sus flores para esta celebración, las pone en alto riesgo de depredación, las *Laelias* producen flores que pueden tardar largo tiempo para desarrollarse, tienen un largo ciclo de vida (ej. 56 años ó más en *L. speciosa*) además, sus semillas son muy pequeñas y dependen de hongos micorrízicos para su germinación. La propagación convencional o vegetativa es muy lenta y el comercio y la colecta de esta orquídea crece de forma exuberante cada año. Antes de que sigan el mismo proceso de especies del mismo género como: *L. gouldiana* que ya ha desaparecido de la naturaleza y otras más como *L. anceps* subs. *Dawsoni*, *L. speciosa* y *L. superbiens* que se encuentran en una categoría de riesgo en la NOM-059 SEMARNAT. El presente estudio explora la regeneración *in vitro* de *L. albida*.

El Cultivo de Tejidos Vegetales es una alternativa para lograr su conservación, que aporta el conocimiento del desarrollo de la especie e investigación en el germoplasma, almacenamiento a largo plazo y evitar la destrucción del material biológico por factores bióticos y abióticos. Además se puede lograr una germinación de forma asimbiótica, esto permite mantener la viabilidad genética de las poblaciones naturales. La propagación *in vitro* es capaz de abastecer la demanda comercial sin poner en riesgo este recurso natural, dándonos la oportunidad de reducir la explotación de poblaciones silvestres de *L. albida*.

4. Objetivos.

4.1 Objetivo general.

Establecer las condiciones de propagación *in vitro* de *L. albida* a partir de diferentes tipos de explantes.

4.2 Objetivos particulares.

- ✓ Determinar la viabilidad de las semillas maduras.
- ✓ Lograr el establecimiento aséptico de cultivos *in vitro* de semillas maduras.
- ✓ Evaluar la germinación y desarrollo *in vitro* en dos medios de cultivo (MS y KC).
- ✓ Evaluar las respuestas morfogénicas de diferentes explantes (tallos y raíces) promovidas con diferentes concentraciones de RCV: auxinas (ANA) y citocininas (BA y TDZ).
- ✓ Establecer condiciones de aclimatización para las plántulas regeneradas *in vitro*.

5. Materiales y métodos.

5.1 Selección del material biológico.

Para el presente estudio se utilizaron semillas provenientes de 4 cápsulas dehiscentes de *L. albida* producto de la polinización natural, las semillas fueron almacenadas a temperatura ambiente en 2 sobres de papel. El material fue colectado en marzo del 2015 en el municipio de San Lucas Teteletitlán en la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán Puebla, y fue donado al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología UNAM en junio del 2015 por la Ingeniera Raquel Cid Muñoz de la Universidad Tecnológica de Tehuacán.

5.2 Propagación *in vitro* de *L. albida* por semillas.

5.2.1 Establecimiento de características y método de almacenamiento de las semillas.

5.2.1.1 Peso y medición de semillas.

Para determinar el peso individual de las semillas se pesó 1 mg de semillas las que se contaron y su número se dividió entre 1000, obteniendo el peso de la semilla en μg , la determinación del peso se relaciona con el contenido de humedad en las semillas (Shousntari, 1994; citado en Ortiz, 2001). Se midió el largo y el ancho de 50 semillas tomadas al azar de cada sobre con un microscopio estereoscópico, con el software AXiovision® y con los datos se calculó un promedio general.

5.2.1.2 Almacenamiento de semillas.

Los sobres de papel bond que contenían las semillas se colocaron dentro de un frasco de vidrio, con desecante Cloruro de calcio (anhidro) (CaCl_2) y se refrigeraron a 4 ± 1 °C, hasta su siembra *in vitro*, tres meses después de la colecta (en junio 2015).

5.2.2 Detección de viabilidad de semillas.

Para determinar la viabilidad de las semillas se usó y modificó el método de Santos (2002) y Ortiz (2001). Con uso del microscopio estereoscópico se contaron 100 semillas de cada sobre (2 sobres), se colocaron en dos cajas de Petri de 5 cm de diámetro, se les adicionaron 3 ml de Cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolio (TTZ) al 1 %. Las cajas de Petri fueron forradas con papel aluminio para privarlas de la luz y se colocaron en una mesa de agitación orbital, a una temperatura de 25 ± 2 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, se observaron las semillas con un microscopio de estereoscópico y con el software AXiovision®, se examinaron de acuerdo al color de la reacción, también se contabilizaron las semillas con embrión y las semillas vacías

5.2.3 Establecimiento aséptico y siembra *in vitro* de semillas.

Las semillas del sobre 1 (Lote 1) se pesaron y se dividieron en 2 partes iguales (22 mg), al igual que las semillas del sobre 2 (Lote 2) se pesaron y se dividieron en 2 partes iguales (30 mg), con el empleo de una balanza analítica.

Para la desinfección de semillas se utilizó el método de la jeringa (Seaton y Ramsay, 2005). El cual se llevó a cabo dentro de una campana de flujo laminar en condiciones asépticas, se utilizaron jeringas de 5 ml nuevas y estériles.

El lote 1 se desinfectó en 2 jeringas, donde se colocaron 22 mg de semillas en cada una, con 4 ml de solución desinfectante (10 % NaClO V/V) manteniéndolas en agitación durante 10 minutos.

Para el lote 2 de igual manera se usaron 2 jeringas, donde se colocaron 30 mg de semillas en cada una, con 4 ml de solución desinfectante (5 % NaClO V/V) manteniéndolas en agitación durante 5 minutos.

Al concluir el tiempo de agitación en cada una de las jeringas, se retiró la solución desinfectante y se realizaron 3 enjuagues con agua destilada esterilizada, durante 1 minuto cada enjuague (Fig. 7-A).

Posteriormente las semillas contenidas en las 2 jeringas del lote 1, se sembraron con ayuda de una espátula en dos diferentes medios, las semillas de una jeringa en 12 frascos de medio semisólido MS al 50 % de sus sales inorgánicas y al 100 % de sus compuestos orgánicos (MS50/100) (Apéndice 1) y las semillas de la segunda jeringa en 12 frascos de medio semisólido KC (Apéndice 2). Se realizó el mismo proceso de siembra para el lote 2.

Los cultivos estuvieron incubados bajo un fotoperiodo de 16 horas luz- 8 horas oscuridad a 25 ± 2 °C (Fig. 7-B).

5.2.4 Germinación *in vitro* de semillas de *L. albida*.

Los cultivos de semillas sembradas en los medios MS50/100 y KC fueron observados 3 veces cada 7 días durante 100 días (Fig. 7-C).

Se obtuvo el porcentaje de germinación basado en el peso total de semillas sembradas en cada lote y en cada medio de cultivo de acuerdo al peso individual de una semilla, con el número total de semillas sembradas en los medios de cultivo, y el total de semillas germinadas después de 100 días de su siembra *in vitro* se calculó el porcentaje de germinación.

Para la descripción del desarrollo de la germinación de semillas de *L. albida* se tomaron en cuenta las etapas o estadios propuestos por Arditti (1966) y Harrison y Arditti (1978) (Tabla 10).

Tabla 10 Etapas o estadios del desarrollo de la germinación de orquídea propuesta por Arditti (1966), Harrison y Arditti (1978).

Etapa o Estadio	Estructura
1	✓ Semilla
2	✓ Semilla hinchada
3	✓ Protocormo
4	✓ Plántula con una hoja
5	✓ Plántula con dos hojas
6	✓ Plántula con raíz.

5.2.5 Desarrollo y multiplicación de plántulas obtenidas de la germinación *in vitro*.

Después de 100 días de la siembra *in vitro* de las semillas, las plántulas germinadas en los medios semisólidos MS50/100 y KC de los lotes 1 y 2, se midieron y subcultivaron en medio semisólido MS50/100 (Apéndice 1) adicionado con un RCV, BA (0.1 mg/L). En el cual permanecieron en inducción durante 30 días, (Fig. 7-D).

Al término de la inducción las plántulas fueron subcultivadas en medio semisólido MS50/100 (Apéndice 1) donde permanecieron durante 50 días (Fig. 7-E).

Posteriormente las plántulas fueron subcultivadas en medio MS50/100 adicionado con CA (0.5 g/L) para evitar la oxidación, donde se subcultivaron cada 60 días durante 200 días, en las mismas condiciones de medio de cultivo, incubación y fotoperiodo (Fig. 7-F).

Al finalizar los 200 días, para sacar el promedio de longitud se midió desde la punta de la hoja, hasta la raíz más larga de cada plántula y se contabilizaron los brotes para obtener el promedio de multiplicación y crecimiento.

Después se seleccionaron 120 plántulas de 2 a 3 cm que se utilizaron para la disección y cultivo independiente de tallos y raíces con RCV (ANA y TDZ). Se seleccionaron también 90 plántulas de 5 cm para tratamientos de aclimatización (Fig. 7-G y 7-H).

Las plántulas no seleccionadas fueron subcultivadas en medio MS50/100 (Apéndice 1) sin RCV (Fig. 7-L).

5.2.6 Respuestas morfogénicas de cultivos de tallos y raíces.

Se utilizaron 120 plántulas de 2-3 cm de altura, de las cuales se disectó el tallo (0.5 cm) y la raíz (1 cm) que posteriormente fueron subcultivados individualmente en frascos con medio semisólido

MS50/100 (Apéndice 1) adicionando con un barrido hormonal constituido de diferentes combinaciones de ácido naftalenacético (ANA) en concentraciones 0 mg/L, 0.1 mg/L y 0.5 mg/L con tidiazurón (TDZ) 0 mg/L, 0.1 mg/L, 0.5 mg/L y 1 mg/L, donde se realizaron 12 tratamientos (Tabla 11) con 10 repeticiones., el período de inducción fue de 70 días (Fig. 7-I).

Después de la inducción, fueron subcultivados en medio MS50/100, donde permanecieron 200 días, con las mismas condiciones de incubación, y con subcultivos cada 60 días (Fig. 7-J).

Para todos los tratamientos, todos los medios de cultivo, agua destilada fueron esterilizados en autoclave a 1.5 kg/cm², 120C, 17min. Todos los cultivos fueron incubados a 25 ± 2 °C con un fotoperiodo de 16 horas luz - 8 horas oscuridad.

Tabla 11 Tratamientos utilizados para inducir respuestas morfogénicas con auxina (ANA) y citocinina (TDZ) a partir de segmentos de tallo y raíz de plántulas de *L. albida* provenientes de germinación *in vitro*.

	TDZ	0 mg/L	0.1 mg/L	0.5 mg/L	1 mg/L
ANA					
0 mg/L		A (control)	B	C	D
0.1 mg/L		E	F	G	H
0.5 mg/L		I	J	K	L

5.2.6.1 Análisis estadístico

Las variables evaluadas en los explantes de tallo fue el número de brotes por cada explante de tallo, y el crecimiento longitudinal en los explantes de raíz. Con los datos obtenidos se hizo un Análisis de Varianza (ANOVA), se utilizó un nivel de confianza de $p \leq 0.05$. En los casos donde se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, se hizo una comparación múltiple con la prueba de Tukey (HSD), con el paquete estadístico NCSS versión 07.1.21.

5.2.7 Establecimiento *ex vitro*.

5.2.7.1 Aclimatización de plántulas germinadas y desarrolla *in vitro*.

Se utilizaron plántulas provenientes de la germinación de semillas de *L. albida*, multiplicadas con BA 0.1 mg/L (30 días de inducción y 250 días en multiplicación) seleccionándose 30 plántulas para cada tratamiento (3), con las siguientes características: altura 5 cm, con 3 hojas o más y 3 raíces o más. Estas fueron extraídas del medio de cultivo y se lavaron para retirar los residuos del medio, posteriormente se aclimatizaron en contenedores de plástico con tapa, transparentes, para conservar la humedad, en 3 mezclas de sustratos esterilizados (Corteza, Agrolita y Tepojal) (Tabla 12).

Los contenedores con las plantas aclimatizadas se mantuvieron en un invernadero a una temperatura 25 ± 2 °C, regándolos una vez por semana, se observaron y se calculó el porcentaje de supervivencia después de 100 días de aclimatización (Fig. 7-G).

Tabla 12 Mezclas de sustratos para la aclimatización de plantas de *L. albida* provenientes de la germinación *in vitro*.

Tratamiento	Partes-Corteza	Partes-Agrolita	Partes-Tepojal
1	1-Corteza	1-Agrolita	1-Tepojal
2	2-Corteza	0-Agrolita	1-Tepojal
3	2-Corteza	1-Agrolita	0-Tepojal

5.2.7.2 Aclimatización de plántulas regeneradas a partir de cultivos de tallos.

Las plántulas regeneradas a partir de los cultivos de tallos, con los RCV: ANA y TDZ, (70 días de inducción y 200 días de multiplicación), fueron seleccionadas 30 plántulas con altura de 5 cm, con 3 a 5 hojas y raíces, se extrajeron del medio de cultivo y se lavaron para retirar residuos. Inmediatamente se aclimatizaron en un contenedor con tapa, de plástico transparente, en una mezcla sustratos esterilizados de corteza y agrolita (partes 2:1).

El contenedor con plantas aclimatizadas se colocó en un invernadero a una temperatura de 25 ± 2 °C, y se regaron 1 vez cada semana, se observaron y se registró el porcentaje de supervivencia después de 100 días de aclimatización (Fig. 7-K).

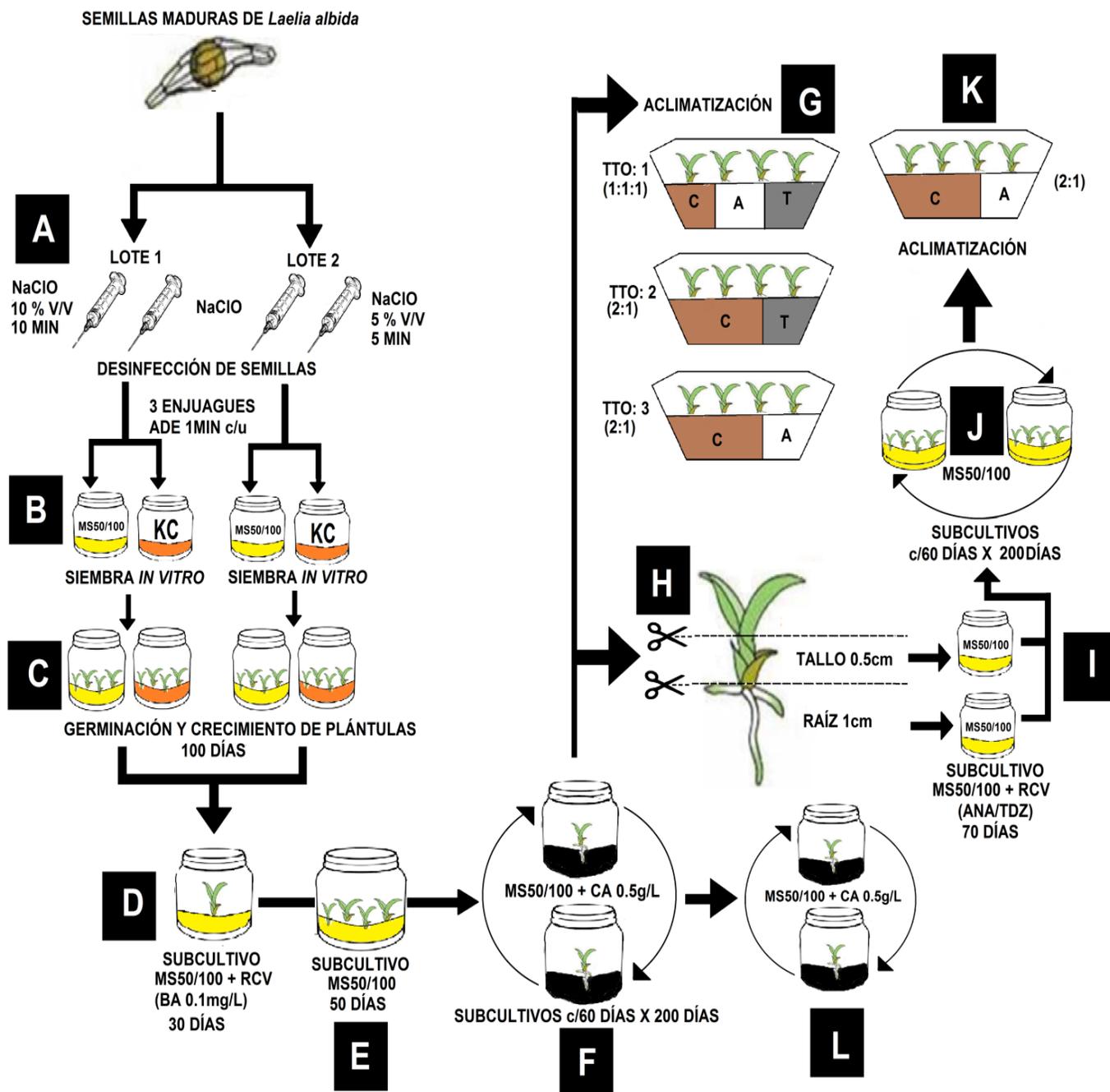


Fig. 7 Propagación *in vitro* de *L. albida* por semillas maduras.

A) Desinfección de semillas; B) Siembra *in vitro* en medio MS50/100 y KC; C) Germinación y crecimiento de plántulas (100 días); D) Inducción en MS50/100+BA (0.1 mg/L) (30 días); E) Subcultivo en MS50/100 (50 días); F) Subcultivo MS50/100+CA (0.5 mg/L) (200 días); G) Acclimatización (Tabla 12); H) Disección de tallo y raíz; I) Siembra *in vitro* de tallo y raíz en MS50/100+ANA y TDZ (inducción 70 días) (Tabla 10); J) Multiplicación de tallo y raíz en MS50/100 (200 días); K) Acclimatización de plántulas regeneradas de tallos; L) Subcultivos de germoplasma. (Abreviaturas- A: Agrolita; ANA: Ácido α -naftalenacético; ADE: Agua destilada esterilizada; BA: N⁶-benciladenina; C: Corteza; CA: Carbón activado; cm: centímetros; CTV: Cultivo de Tejidos Vegetales; c/u: Cada uno; c/60: cada 60; g/L: gramos por litro; KC: Medio de cultivo Knudson C; mg/L: miligramos por litro; MIN: minutos; MS50/100: MS con 50 % de sales inorgánicas y 100 % de compuestos orgánicos; NaClO: Hipoclorito de sodio; RCV: Reguladores de crecimiento vegetal; T: Tepojal; TTO: Tratamiento; TDZ: Tiazurón; % V/V: porcentaje volumen-volumen; X: por ó durante).

6. Resultados y discusión.

6.1 Propagación *in vitro* de *L. albida* por semillas maduras.

6.1.1 Características de semillas.

Las semillas de *L. albida* provenientes de cápsulas maduras son de pequeño tamaño, longitud promedio de 0.6 mm; y de ancho su promedio es de 0.1 mm (Fig. 8). En un 1 mg de semillas se contabilizaron 3 500 semillas, por lo tanto el peso promedio es de 3.5 µg de cada semilla. Su testa es delgada y en forma de red.



Fig. 8 Semillas de *L. albida*.

La estructura y el tamaño de las semillas de *L. albida* usadas para el presente estudio están dentro de los parámetros establecidos por Arditti (1967); son diminutas, pesan de 0.3 a 14 µg y la medida promedio es de 0.250 a 1.2 mm en longitud y 0.090 a 0.270 mm en ancho. Se producen en grandes cantidades, de 1300 a 4000000 de semillas por cápsula, en general, las semillas constan de una testa (cubierta seminal), que encierra un embrión que es extremadamente pequeño, está poco diferenciado y consta de unos cuantos cientos de células solamente (Velasco y Beltrán, 2008).

Las semillas no tienen cotiledones y contienen escasa reserva alimenticia (sin endospermo). En su ambiente natural para efectuar el proceso de germinación requieren una simbiosis micorrizógena, sin embargo estas semillas contienen una inclusión aceitosa que puede ser suficiente para la respiración pero no para desarrollarse (Arditti y Abdul 2000).

Harrison y Arditti (1978) mencionan que las semillas al carecer de cotiledones y endospermo no tienen la capacidad de convertir estos lípidos en carbohidratos lo que explica el requerimiento de una fuente exógena de carbohidratos en ellas.

6.1.2 Viabilidad de semillas.

De las 200 semillas de *L. albida* que se utilizaron para la prueba de viabilidad con Cloruro 2, 3, 5 trifenil tetrazolio (TTZ) se obtuvieron los siguientes resultados: para los lotes 1 (100 semillas) y 2 (100 semillas) la viabilidad fue poca o casi nula, los embriones no se tiñeron de color rojo o rosado, se tiñeron de color negro como se muestra en la Fig. 9-A. En el lote 1, 13 semillas y en el lote 2, 29 semillas.

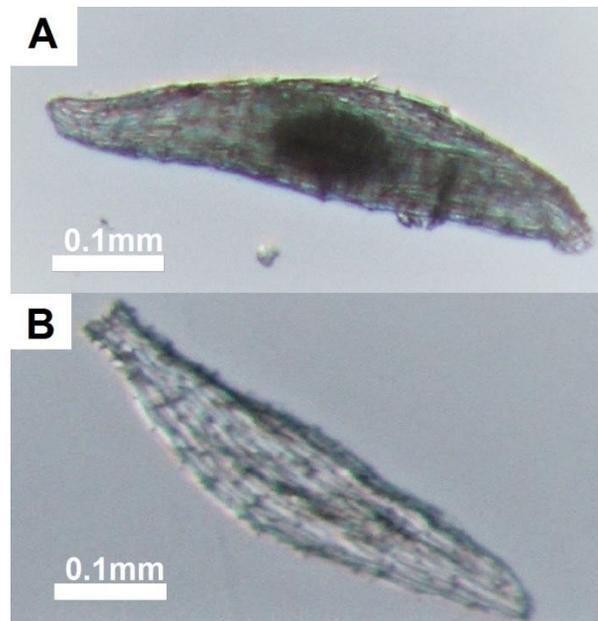


Fig. 9 Semillas de *L. albida* después de 24 horas embebidas en TTZ. A) Semilla con embrión en color negro; B) Semilla vacía, sin embrión.

Al examinar las semillas se observó que en el lote 1, 87 de las semillas no contenían embrión y en el lote 2, 71 semillas no contenían embrión como se muestra en la figura 9-B, los porcentajes de las semillas con embrión y las semillas vacías se muestran a continuación en la Tabla 13.

Tabla 13 Lotes 1 y 2 de semillas de *L. albida* y porcentajes de semillas con embrión y semillas vacías.

Lote	Semillas con embrión (%)	Semillas vacías (%)
1	13 %	87 %
2	29 %	71 %

La viabilidad de semillas se define como la capacidad potencial que tienen éstas para geminar, las semillas viables en condiciones ambientales adecuadas que no germinan se dice que están latentes y esta latencia puede deberse a inmadurez fisiológica del embrión, impermeabilidad de la testa a la

entrada de agua o gases, requerimientos específicos de luz o temperatura, o bien a la presencia de sustancias inhibitoras de la germinación (Santos, 2002).

La prueba de viabilidad TTZ permite conocer la viabilidad de una población de semillas y especular si presentan latencia, y es una forma de corroborar los datos de germinación, esta prueba interviene en la respiración de la semilla. El TTZ es un indicador de óxido-reducción que en contacto con el tejido vivo se reduce tiñéndose en un color rojizo. La actividad de los sistemas enzimáticos decrece paralelamente con la viabilidad de las semillas, por lo tanto una coloración rojo -intenso es indicadora de la presencia de células vivas del embrión. En cambio la falta de coloración o coloración rosa – pálido son indicadoras de la muerte o disminución de la viabilidad de las células embrionarias (Moreno 1984). La semillas de orquídea son de tipo ortodoxo, una semilla ortodoxa es aquella tolerante a la desecación y capaz de mantener su viabilidad tras ser desecada a menos de 5-10 % de contenido de humedad, pueden ser almacenadas a bajas temperaturas y humedad sin perder su poder germinativo (Iriando, 2001).

La viabilidad y la germinación natural de la orquídeas se dificulta porque sus semillas son diminutas y carecen de endospermo, por esta razón, requieren de una relación obligada con hongos micorrízicos (Arditti, 1982). Cortez (2006) menciona que un fruto de *L. speciosa* tiene de 250000 a 1000000 de semillas, donde sólo 1 de cada 5000 a 20000 semillas germinan de manera natural.

En los resultados de viabilidad de los lotes 1 y 2 revelaron poca viabilidad esto puede estar relacionado con distintos factores: las condiciones de almacenamiento en las que se mantuvieron inmediatamente después de su colecta. Las semillas fueron colectadas en marzo del 2015 y donadas y utilizadas tres meses después, en este tiempo las semillas permanecieron en temperatura ambiente y esto posiblemente causó que perdieran viabilidad, asimismo lo expone Knudson (1922) (citado por Ortiz, 2001) quien afirmó que las semillas de orquídea almacenadas a temperatura ambiente (21-22 °C), la mayoría perderá su viabilidad relativamente rápido.

Ortiz (2001) reportó que semillas de *L. albida* al secarse y almacenarse en un desecador con refrigeración a 4 °C desde el momento de la colecta conservaron su viabilidad 64 % durante el primer mes y del 14.5 % almacenadas durante 8 meses. Asimismo Santos (2002) reportó una viabilidad del 90-98 % de semillas de *L. albida* almacenadas a una temperatura de 4 °C durante un año y del 78-88 % cuando fueron almacenadas durante dos años en las mismas condiciones de temperatura, ambos lotes de semillas fueron almacenados inmediatamente después de su colecta. Por lo tanto Ortiz (2001) y Santos (2002) indicaron que los porcentajes de viabilidad en semillas de *L. albida* disminuyeron al pasar mayor tiempo, causado por cambios que ocurren en los tejidos o células del

embrión por las circunstancias de almacenamiento o bien por el envejecimiento natural de las semillas.

La poca viabilidad también se ve relacionada a semillas carentes de embriones. Respecto a esto, Ortiz (2001) reportó 40 % de semillas vacías en *L. albida* y Santos et al. (2006) reportaron semillas maduras de *L. albida* sin embrión y atribuye esta condición al efecto de diversos factores ecofisiológicos (ej. el tamaño y número de poblaciones, el sistema reproductivo, mecanismos de dispersión), de variabilidad genética (ej. selección, mutaciones, deriva genética, endogamia), y del medio ambiente; dentro de estos últimos factores, se tienen aquellos independientes del ser humano (ej. eventos catastróficos), o bien dependientes del ser humano (ej. pérdida del hábitat, la introducción de especies, la extracción de los recursos, degradación y contaminación ambiental) (Ávila y Salgado, 2006). Este carácter no es únicamente de la especie, se tiene reportado en otras especies del género *Laelia*. Maya (2010) señala que en frutos verdes de *L. speciosa*, en su mayoría, las semillas contenían embriones viables y en frutos amarillentos y dehiscentes carecían de embrión; lo anterior lo atribuye a que esta planta requiere de un agente polinizador externo para su reproducción sexual. Aguilar y López (2013) observaron que las semillas provenientes de cápsulas maduras de *L. speciosa* carecían de embrión y lo relacionaron a que los índices demográficos de la población son afectados por la disminución de individuos y el cambio de uso de suelo, lo que podría causar problemas de endogamia.

Este problema es perturbador y está afectando directamente en la germinación de nuevos individuos en la naturaleza al mismo tiempo existe la pérdida de variabilidad genética, lo que puede conllevar a la extinción de orquídeas en un futuro.

6.1.3 Establecimiento aséptico de semillas.

En el lote 1 no ocurrió contaminación, en ninguno de los frascos con medio MS50/100 y KC, las semillas se desinfectaron con NaClO 10 % V/V durante 10 minutos. En el lote 2 el 50 % de los frascos en medio MS50/100 y el 50 % de los frascos en medio KC se contaminaron con hongos donde la desinfección de las semillas fue con NaClO 5 % V/V durante 5 minutos, la contaminación empezó después de 10 días de la siembra *in vitro*, 30 días después de sembrar las semillas *in vitro*, se registró el último frasco contaminado (Tabla 14).

Tabla 14 Porcentajes de contaminación en cultivos de semillas sembradas *in vitro* de *L. albida* en medio MS50/100 y KC. Resultados después de 30 días de iniciados los cultivos.

Lote	Concentración de NaClO y tiempo de exposición	Medio de cultivo-	Total de frascos.	Fracos contaminados	Porcentaje de contaminación.
1	NaClO 10 % V/V 10 minutos	MS50/100	12	0	0 %
		KC	12	0	0 %
2	NaClO 5 % V/V 5 minutos	MS50/100	12	6	50 %
		KC	12	6	50 %

6.2 Germinación y desarrollo de semillas de *L. albida*.

Los porcentajes de germinación de los lotes 1 y 2 se resumen en la siguiente Tabla (15), en donde se muestra el número de lote, el medio de cultivo utilizado, el peso en mg de semillas que fueron sembradas *in vitro*, el número aproximado de semillas sembradas *in vitro*, el porcentaje de semillas con embrión, el aproximado de semillas con embrión, las semillas germinadas en los lotes y en los medios de cultivo, el porcentaje total de germinación y el porcentaje de germinación de las semillas con embrión.

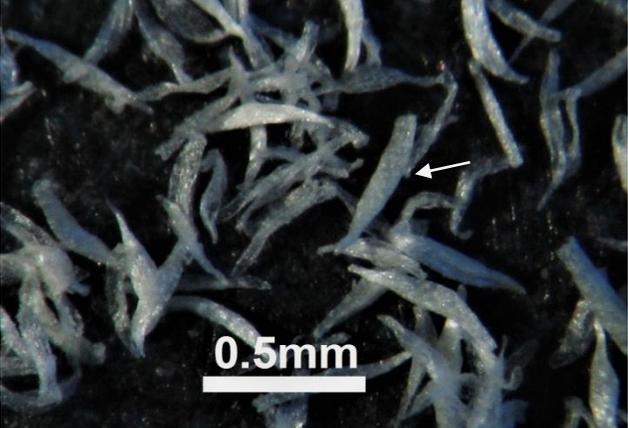
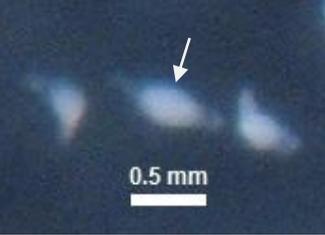
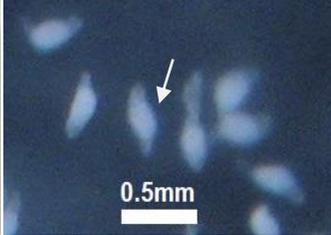
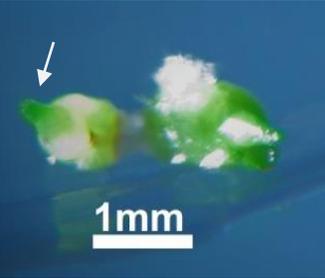
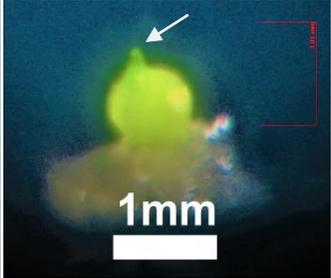
Tabla 15 Porcentaje de germinación de semillas maduras de *L. albida* de los lotes 1 y 2 en medios de cultivo MS50/100 y KC. Resultados después de 100 días de iniciados los cultivos.

Lote	Medio de cultivo	Peso de Semillas (mg)	Total de semillas.	Semillas con embrión (%)	Semillas con embrión.	Semillas germinadas	Germinación de semillas (%)	
							Total	Con embrión
1	MS50/100	22mg	77 000	13 %	10 010	6	0.007 %	0.06 %
	KC	22mg	77 000	13 %	10 010	3	0.004 %	0.03 %
2	MS50/100	30mg	105 000	29 %	30 450	49	0.046 %	0.16 %
	KC	30mg	105 000	29 %	30 450	56	0.053 %	0.18 %

6.2.1 Descripción de la germinación y desarrollo de *L. albida*.

Para la descripción de germinación y el desarrollo de semillas se tomaron en cuenta las etapas o estadios propuestos por Arditti (1966) y Harrison y Arditti (1978): 1) Semilla, 2) Semilla hinchada, 3) Protocormo, 4) Plántula con 1 hoja, 5) Plántula con dos hojas y 6) Plántula con raíz, la germinación y el desarrollo se observó en los medios de cultivo MS50/100 y KC en el lote 2 (Tabla 16).

Tabla 16 Descripción de la germinación y el desarrollo *in vitro* de *L. albida* en medios de cultivo MS50/100 y KC.

Estadio- Estructura	Descripción	Medio MS50/100	Medio KC
1) Semilla	El día de desinfección y siembra <i>in vitro</i> las semillas maduras tenían forma alargada y con los extremos redondeados, la testa de color beige y translúcida, a simple vista no se observaba el interior de las semillas, sólo con un microscopio estereoscópico se notaban los embriones, los cuales tenían forma ovoide, eran color beige y ocupaban una tercera parte del espacio dentro de la semilla, situándose en el centro.	 <p style="text-align: center;">Día 0: Desinfección y siembra <i>in vitro</i>.</p>	
2) Semilla hinchada.	Después de 15 a 25 días de la siembra <i>in vitro</i> , los embriones se hincharon, algunos rompiendo la testa y se observaron con una tenue tonalidad verde, esto sucedió en ambos medios de cultivo (MS50/100 y KC) de forma asincrónica.	 <p style="text-align: center;">Día 15</p>	 <p style="text-align: center;">Día 15</p>
3) Protocormo	Después de 25 a 35 días de la siembra <i>in vitro</i> , los embriones se desarrollaron y formaron un protocormo de forma esférica, con una epidermis lisa y de color verde claro, tenía la región del ápice de color verde oscuro y el otro extremo presentaba rizoides.	 <p style="text-align: center;">Día 25</p>	 <p style="text-align: center;">Día 25</p>

La germinación de *L. albida*, como en otras especies, marca la transición del estado del embrión latente a una forma metabólicamente activa, en donde se producen eventos como el aumento de la tasa de respiración, la síntesis de enzimas y ácidos nucleicos, la división celular e hidratación de proteínas, estos eventos dependen de la luz, el agua y la temperatura. El proceso de germinación se inicia con la imbibición (movimiento del agua al interior del embrión), produciendo el aumento de volumen que rompe la testa, al formarse una estructura esférica denominado protocormo. A partir del agregado de células, del protocormo se pueden distinguir un meristemo, el vástago, en la parte superior y por otra parte los rizoides (Arditti, 1992; Santos, 2002).

Los porcentajes de germinación fueron muy bajos en ambos lotes (1 y 2) menores al 1 %. Es ampliamente relacionado con los resultados que se obtuvieron con la prueba de viabilidad. Sin embargo existen otros factores que posiblemente afectaron en la germinación de esta especie, como la concentración del desinfectante NaClO y el tiempo de exposición. Ortiz (2001) reportó que el hipoclorito de sodio (NaClO) en diferentes concentraciones en exposición prolongada ocasiona que la testa experimente una ruptura severa y por lo tanto, dañe al embrión, dándole una coloración blanca e incluso en algunos casos transparentes, obtuvo el 1 % de germinación en semillas de *L. albida* a pesar de que presentaron 64 % de viabilidad, aplicó para la desinfección NaClO 10 % V/V durante 20 minutos; Aguilar y López (2013) reportaron la desinfección de semillas de *L. speciosa* con NaClO 15 % V/V durante 15 minutos y no obtuvieron germinación.

Por otra parte, en estudios de germinación de *Laelias* donde la concentración fue menor y también en tiempo de exposición del desinfectante (NaClO) hubo un mayor porcentaje de germinación. Santos (2002) desinfectó semillas de *L. albida* con NaClO 5 % V/V durante 5 minutos, las sembró en medio KC y obtuvo 80-90 % de germinación. Ordóñez (2015) desinfectó semillas de *L. superbiens* con NaClO 10 % V/V durante 5 minutos, obteniendo porcentajes del 100 % de germinación en medio MS, sin embargo se presentó contaminación fúngica y bacteriana.

En una cápsula abierta las semillas dejan de ser estériles y requieren un proceso de esterilización que puede ser agresivo a las diminutas semillas, sin embargo cuando se descontamina la cápsula cerrada, las semillas son poco afectadas, porque no tienen contacto directo con los desinfectantes y no han sido expuestas al exterior donde fácilmente se pueden dañar. En estudios donde se utilizaron cápsulas cerradas de *Laelia* la germinación ha sido exitosa. Potisek *et al.* (1996) reportaron la germinación de semillas provenientes de cápsulas cerradas de *L. rubescens*, en medio de cultivo MS, obteniendo el 62.5 %. Ávila y Salgado (2006) reportaron 100 % de germinación de semillas *L. albida*, *L. autumnalis* y *L. speciosa* provenientes de cápsulas maduras (previa a su apertura) en medio MS. Romero *et al.* (2007) lograron 100 % de germinación en semillas de *L. anceps* en medio MS provenientes de cápsula.

En la siembra *in vitro* de semillas de *L. albida* en el medio de cultivo Knudson C, germinaron 3 semillas del lote 1 (0.004 %) y 56 semillas del lote 2 (0.053 %), considerablemente relacionado a la poca viabilidad que poseían las semillas, este medio de cultivo ha sido utilizado para germinar orquídeas asimbióticamente desde que Lewis Knudson lo reportó en 1922.

En los resultados del presente estudio las plántulas que germinaron en medio KC, después de 100 días de la siembra *in vitro* resultaron ser más pequeñas longitudinalmente (promedio 1 cm) comparadas con las plántulas germinadas en medio MS50/100 (promedio 2-2.3 cm). El medio Knudson C es eficiente para la germinación, sin embargo al pasar el tiempo las plantas necesitarán más nutrientes, Ortiz (2001) germinó semillas maduras de *L. albida* en medio KC donde obtuvo el 1-5 % de germinación, esto dependiendo al tiempo de almacenamiento de 1-8 meses, las semillas con 1 mes de almacenamiento la germinación ocurrió a los 8 días, en dos meses de almacenamiento la germinación ocurrió 21 días después de la siembra *in vitro*, entre mayor es el tiempo de almacenamiento la germinación se prolonga más porque la viabilidad disminuye. Por los bajos porcentajes que presentó, recomendó el empleo de otros medios de cultivo, RCV en diferentes concentraciones, y de algunos aditivos como el agua de coco o extracto de plátano, para optimizar la germinación. Santos (2002) reportó germinación en semillas maduras de *L. albida* del 70-90 %, en medio KC demostró que el medio de cultivo KC permite la germinación, sin embargo al desarrollarse los protocormos a plántulas no tienen los suficientes nutrimentos para continuar su crecimiento, y enriqueció el medio KC con pulpa de papa. Aguilar y López (2013) germinaron semillas de una cápsula de *L. speciosa* en medio KC obteniendo 100 % de germinación después de 178 días, en medio MS la germinación al 100 % ocurrió después de 16 días.

El medio KC se podría tomar en cuenta si se pretendiera establecer un protocolo de conservación *in vitro* por lento crecimiento, que es mantener un tamaño reducido de las plántulas sin que se afecte su viabilidad y sobrevivencia, para así reducir el número de subcultivos y costos de mantenimiento del germoplasma conservado (Bello, 2015).

En el lote 1 las plántulas germinadas en medio MS50/100 y medio KC obtuvieron porcentajes menores al 1 %, en medio MS50/100 el porcentaje de germinación fue mayor al KC por una diferencia del 0.003 %. En el lote 2 las plántulas germinadas en medio MS50/100 y medio KC obtuvieron porcentajes menores al 1 %, en medio KC el porcentaje de germinación fue mayor al medio MS50/100 por una diferencia del 0.007 %. Estas diferencias son poco significativas, por lo que se optó por el medio de cultivo de acuerdo al desarrollo y tamaño de las plántulas, y así se descartó el medio KC después de 100 días de la siembra *in vitro* de semillas, porque se buscó el crecimiento y desarrollo más rápido de plántulas de *L. albida* para lograr ser aclimatizadas.

El medio MS ha sido reportado en la germinación y crecimiento exitoso de diferentes especies de *Laelias* por lo que se optó su uso para los siguientes subcultivos. Potisek *et al.* (1996) reportaron la germinación de semillas de *L. rubescens*, obteniendo el 62.5 %. Velázquez (1997) logró la germinación en semillas de *L. speciosa* del 80-100 %. Ávila y Salgado (2006) germinaron semillas *L. albida*, *L. autumnalis* y *L. speciosa* obteniendo una exitosa germinación de 100 %. Sierra (2006) germinó el 100 % de semillas de *L. autumnalis*. Cortez (2006) reportó 82 % de germinación en semillas de *L. speciosa* en medio MS enriquecido con fructosa. Ávila *et al.* (2009) reportaron el 60 % de germinación en semillas de *L. speciosa*. Vergara *et al.* (2010) reportaron la germinación del 100 % en semillas de *L. autumnalis*. Aguilar y López (2013) reportaron la germinación del 100 % en medio MS50 añadido de CA (1 %), en semillas de *L. speciosa*. Ordóñez (2015) germinó el 100 % de semillas de *L. superbiens* en medio MS añadido de CA (1 g/L).

6.3 Multiplicación y desarrollo de plántulas de *L. albida* provenientes de germinación *in vitro* de semillas maduras.

El crecimiento de las plántulas de *L. albida* y la formación de brotes adventicios fue estimulado debido a los bajos porcentajes de germinación en los lotes 1 y 2 (>1 %). En el periodo de multiplicación el medio de cultivo se tiñó de color café por la oxidación en la base de las plántulas, y para prevenir la oxidación se añadió CA (0.5 g/L).

Transcurrido el tiempo de multiplicación (250 días) Las plántulas regeneraron brotes adventicios vía organogénesis directa, en el lote 1 con un promedio de 5 brotes por plántula y en el lote 2 con un promedio de 6 brotes por cada plántula (Tabla 18).

Tabla 18 Multiplicación de plantas de *L. albida* provenientes de germinación *in vitro*, multiplicadas en medio MS50/100 + BA (0.1 mg/L) durante 30 días de inducción y 250 días de multiplicación en medio MS50/100 sin RCV.

Lote	Plantas provenientes de semillas.	Plántulas multiplicadas con BA (0.1 mg)	Promedio de brotes/plántula
1	9	45	5
2	105	420	6

El empleo del medio MS añadido de bajas concentraciones de BA, ha sido utilizado para el crecimiento y desarrollo en diferentes especies del género *Laelia*. Ávila y Salgado (2006) reportaron que al adicionar BA en una dosis de 0.05 mg/L, el proceso de germinación en general se acelera y es homogénea en semillas de *L. albida* y *L. autumnalis*. Ávila *et al.* (2009) reportaron una exitosa germinación (100 %) de semillas y desarrollo de plántulas en *L. speciosa* en medio MS adicionado de BA (0.1 mg/L). Ordóñez (2015) reportó que en plántulas de *L. superbiens* usando medio MS50 + BA (0.1 mg/L), durante una inducción de 30 días y 5 meses en fase de multiplicación en medio MS50 sin

RCV, promovió la regeneración de 10.6 brotes por cada plántula. Raya (2013) reportó que en plántulas de *L. halbingeriana* en medio MS + BA (0.5 mg/L) durante 60 días, promovió el desarrollo de hasta 3.93 hojas. Gómez (2009) reportó en cultivos de tallos de *L. gouldiana*, una morfogénesis directa de brotes, después de una inducción de 75 días en medio MS50/100 + BA (0.5 mg/L) y 105 días en fase de multiplicación en medio MS50/100 sin RCV, promovió la regeneración de 30 brotes por cada explante de tallo.

6.4 Respuestas morfogénicas de cultivos de tallos.

Los resultados del ANOVA no presentaron diferencias significativas ($F_{(11,119)}=1.48$; $P=0.149$) entre los tratamientos de los cultivos de tallo (Tabla 19).

Tabla 19 Resultados de morfogénesis en cultivos de tallos de *L. albida* después de ser inducidos con un barrido hormonal de ANA/TDZ (70 días), y subcultivados en medio MS50/100 sin RCV (200 días).

Las letras en superíndice indican los tratamientos con mayor discrepancia en la media de brotes/tallo.

Tratamiento	ANA/TDZ (mg/L)	Explantos Sobrevivientes	Explantos oxidados	Brotes/Tratamiento	Media Brotes/Tallo
A	0/0	2	8	41	4.1
B	0/0.1	4	6	49	4.9
C	0/0.5	3	7	43	4.3
D	0/1	3	7	17	1.7 ^J
E	0.1/0	3	7	53	5.3
F	0.1/0.1	6	4	75	7.5
G	0.1/0.5	4	6	15	1.5 ^J
H	0.1/1	3	7	50	5
I	0.5/0	4	6	28	2.8 ^J
J	0.5/0.1	8	2	153	15.3 ^{G, D¹}
K	0.5/0.5	6	4	68	6.8
L	0.5/1	4	6	76	7.6

Los cultivos de tallo al momento de la siembra *in vitro* tenían una coloración verde claro, con algunos restos de hoja que lo envolvían (Fig. 10-A). Durante los 10 primeros días, los cultivos tuvieron las primeras señales de oxidación, los explantes y el medio de cultivo se tiñeron de color café claro, al transcurrir el tiempo, la oxidación iba siendo más intensa y el color café era más oscuro, en el tratamiento donde mayor oxidación hubo fue en el tratamiento control A (0/0 mg/L) (80 %) (Fig. 10-D). Después de 70 días de la siembra, los tratamientos con mayor supervivencia a la oxidación fueron el J (0.5/0.1 mg/L) con 80 %; F (0.1/0.1 mg/L) y K (0.5/0.5mg/L) con 60 %. Se presentó la regeneración de nuevos brotes vía organogénesis directa (Fig. 10-B) en todos los explantes no oxidados de todos los tratamientos. Estos brotes siguieron creciendo y desarrollándose en la fase de multiplicación cuando fueron subcultivados a medio sin RCV (Fig. 10-C). Los tratamientos de tallo que presentaron oxidación, J (0.5/0.1 mg/L), K (0.5/0.1 mg/L) y L (0.5/1 mg/L), después de ser subcultivados a medio sin RCV, entre los 5 y 10 días empezaron a desarrollar nuevos brotes vía organogénesis directa (Fig. 10-E). Estos brotes siguieron creciendo durante los siguientes días, tenían como base el tallo oxidado (Fig. 10-F), posteriormente el tallo oxidado se desprendió cuando los brotes comenzaron a formar raíces, después de 120 días en medio sin RCV (Fig. 10-H). En los explantes donde hubo regeneración de brotes, se regeneraron más de 1 brote, después de 100 días en medio sin RCV en todos los tratamientos (Fig. 10-G), y estos desarrollaron raíces en el transcurso de 200 días en medio sin RCV (Fig. 10-I).

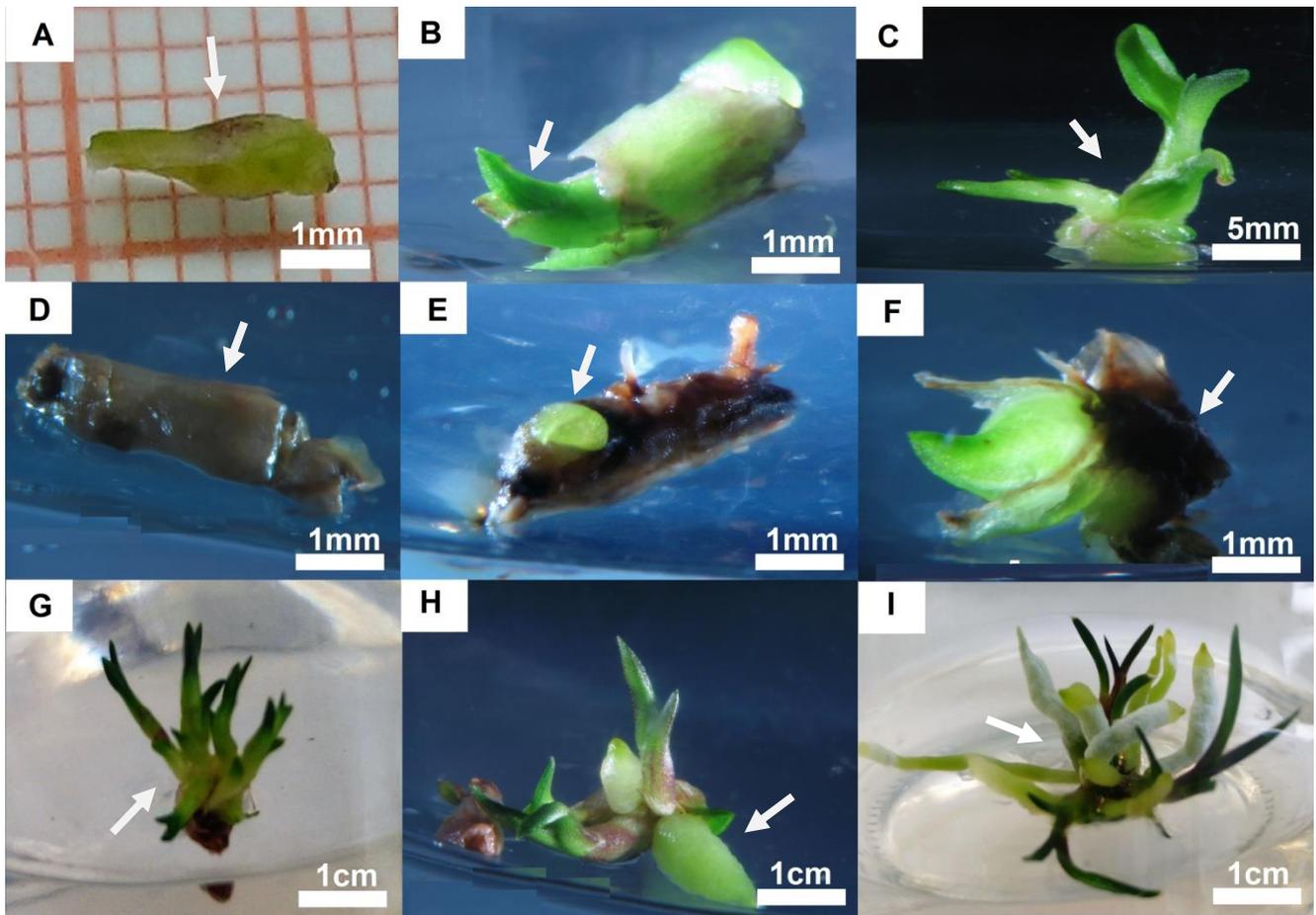


Fig. 10 Respuestas morfológicas en cultivos de tallo de *L. albida*. Después de 70 días de inducción y 200 días en medio MS50/100 sin RCV.

A) Segmento de tallo. Día de siembra *in vitro*; B) Organogénesis directa de un brote. TTO J (0.5/0.1 mg/L) 70 de inducción; C) Desarrollo de brotes vía organogénesis directa, TTO J (0.5/0.1 mg/L) 70 días en inducción y 10 días en medio sin RCV; D) Oxidación de tallo. TTO A (0/0 mg/L) 70 días en inducción; E) Organogénesis directa de un brote, proveniente del tallo oxidado, TTO K (0.5/0.5 mg/L) 70 días en inducción y 100 días en medio sin RCV; F) Desarrollo del brote, proveniente de tallo oxidado, TTO K (0.5/0.5 mg/L) 70 días en inducción y 30 días en medio sin RCV; G) Multiplicación de brotes, 70 días de inducción y 100 días en medio sin RCV; H) Desarrollo raíces, 70 días de inducción y 120 días en medio sin RCV; I) Desarrollo de plántulas completas 70 días de inducción y 200 días en medio sin RCV. (Abreviaturas-cm: Centímetros; mm: milímetros; TTO: Tratamiento).

La oxidación fue el principal problema en los cultivos, y ocasionó la mayor pérdida del material biológico, en los tratamientos de ANA/TDZ: A (0/0 mg/L), C (0/0.5 mg/L), D (0/1 mg/L), E (0.1/0 mg/L) y H (0.1/1 mg/L) (Tabla 19). La oxidación se presentó de manera gradual durante los 70 días de inducción con RCV. El caso es similar a la oxidación que reportó Gómez (2009) en *L. gouldiana*, en segmentos de hoja todos los explantes tenían una porción de oxidación en un tratamiento libre de reguladores y utilizando BA 0.5 mg/L. En segmentos de tallo en combinaciones de ANA y BA 0.1/1 mg/L y 0.5/0.5 mg/L se reportó una oxidación del 100 % en ambos tratamientos, también se reportó el 100 % de oxidación con 1 mg/L de BA. Esto pudo deberse al corte del tallo, Nahuat *et al.* (2001), reportaron que la primera respuesta del tejido es la exudación de compuestos fenólicos en el sitio de corte provocando un severo oscurecimiento del tejido, lo que limita la respuesta del explante, provocando inclusive la muerte del mismo.

Después de la inducción de 70 días y 200 días en medio de cultivo sin RCV, en el tratamiento J (0.5/0.1 mg/L) regeneró vía organogénesis directa el mayor número de brotes (153), y además logró un 80 % de supervivencia en los explantes. Este incremento pudo ocurrir por el impulso hormonal que recibió de la combinación de los RCV y su efecto residual una vez sembrados los explantes en medio libre de RCV. Al término de la inducción y la fase de multiplicación el promedio de brotes por explante fue de 15.3. Un caso contrario fueron los tratamientos G (0.1/0.5 mg/L) y D (0/1 mg/L) con 15 y 17 brotes por tratamiento (Tabla 19).

Una de las características que distingue al TDZ de otros reguladores de crecimiento vegetal de origen natural o sintético es el potente efecto morfogenético que ejerce sobre los tejidos vegetales al ser usado en bajas concentraciones y por periodos relativamente cortos (Murthy *et al.*, 1998 citado en Ordoñez, 2015). La combinación de los RCV ANA y TDZ ha sido reportado por Castañeda (2008), quien con plántulas de *L. anceps* y una combinación de 0.5 mg/L de ANA y 0.48 mg/L de TDZ, logró regenerar 42.1 brotes/explante, después de 60 días de inducción y 5 meses de subcultivos sin RCV, en el tratamiento K (0.5/0.5 mg /L) que fue muy similar a la concentración usada por Castañeda (2008), se obtuvo un promedio 6.8 brotes/explante.

En el tratamiento D donde se usó la mayor concentración de TDZ (1 mg/L) hubo poca regeneración con un promedio 1.7 brotes/explante sin embargo, Castañeda (2008) también reportó que con 1 mg/L de TDZ en plántulas de *L. anceps* obtuvo un promedio 13.4 brotes/explante y Ordóñez (2015) reportó que en plántulas de *L. superbiens* inducidas con 1 mg/L de TDZ logró regenerar en promedio 12.1 brotes/explante, esta diferencia posiblemente se debió a que se usó un fragmento de tallo como explante y no la plántula completa. En el tratamiento B (TDZ 0.1 mg/L) se obtuvo una regeneración de

49 brotes/tratamiento, en el tratamiento C (TDZ 0.5 mg/L) se obtuvo una regeneración de 43 brotes/tratamiento.

En los tratamientos adicionados únicamente con ANA los cuales fueron el E (0.1 mg/L) y el I (0.5 mg/L) presentaron pérdida de explantes por oxidación del 70 y 60 %, y se obtuvo una regeneración de 53 brotes/tratamiento para el tratamiento E y 50 brotes/tratamiento para I. Gómez (2009) quien reportó, al sembrar un segmento de hoja de *L. gouldiana* en medio MS con ANA 0.1 mg/L, regeneró 20 brotes/tratamiento después de 75 días de inducción y 180 días de cultivo. En segmentos de tallo con ANA 0.1 mg/L se obtuvieron 22 PLBs/tratamiento, después de 75 días de cultivo, y también obtuvo regeneración de 88 brotes/tratamiento, durante 180 días de cultivo. En este estudio en ninguno de los tratamientos hubo la formación de PLBs, sin embargo en la regeneración de brotes/tratamiento en los cultivos de tallo es similar, cabe mencionar que el tratamiento usado por Gómez (2009) fue de 20 explantes y en este estudio se usaron 10 explantes de los cuales solo 3 lograron regenerar 53 brotes/ tratamiento. Los brotes del tratamiento E (ANA 0.1mg/L) desarrollaron sus propias raíces, Raya (2013) reportó en plántulas de *L. halbingeriana* subcultivadas en medio MS adicionado con ANA 0.1 mg/L observó que promovió la mayor formación de raíces.

Ávila *et al.* (2009) reportaron que usando plántulas de *L. speciosa* en medio MS adicionado con ANA 0.5 mg/L se obtenía por organogénesis directa de 3-8PLBs/explante y utilizando 1 mg/L de esta misma auxina las plántulas formaron callo.

6.5 Respuestas morfogénicas de cultivos de raíces.

Se utilizaron 10 explantes en cada tratamiento y en la ANOVA ($F_{(11,119)}=3.45$; $P=0.000391$) no hubo diferencia significativa en los tratamientos de cultivos de raíces (Tabla 20).

Tabla 20 Resultados de morfogénesis en cultivos de raíz de *L. albida* después de ser inducidos con un barrido hormonal de ANA/TDZ (70 días) y subcultivados en medio MS50/100 sin RCV (200 días). Las letras en superíndice indican los tratamientos con mayor discrepancia.

Tratamiento	ANA/TDZ mg/L	Explantes sobrevivientes	Explantes oxidados	Promedio-elongación cm	Longitud máxima cm
A	0/0	7	3	1.2	5
B	0/0.1	6	4	0.25	1
C	0/0.5	5	5	0.1	1
D	0/1	8	2	0.3	1
E	0.1/0	9	1	2.9 ^C	7
F	0.1/0.1	7	3	0.7	2
G	0.1/0.5	7	3	0.65	4
H	0.1/1	9	1	0.6	1
I	0.5/0	8	2	3.23 ^{CBD}	9
J	0.5/0.1	7	3	1.35	5.5
K	0.5/0.5	8	2	1.45	10.5
L	0.5/1	7	3	0.6	3

El día de la siembra *in vitro* en los cultivos de ápices de raíz, la raíz se encontraba de color verde (Fig.11-A). Los tratamientos E (ANA 0.1 mg/L) y H (0.1/1 mg/L) tuvieron mayor porcentaje de supervivencia (90 %) solo un explante de cada tratamiento se oxidó después de los 70 días de inducción con RCV, por otra parte en el tratamiento C (TDZ 0.5 mg/L) hubo un mayor porcentaje de oxidación del 50 %, ocurrió principalmente en donde se realizó el corte (Fig. 11-B) y se presentó en el transcurso de 15 a 20 días después de la siembra *in vitro* en medio con RCV, la oxidación progresó en los 70 días que continuó la inducción, al subcultivar en medio sin RCV las raíces presentaban un 100 % de oxidación, estos explantes de raíz fueron consideradas muertas por oxidación.

Como respuestas morfogénicas se obtuvo elongación y formación de velamen, en el tratamiento K (0.5/0.5 mg/L) una de las raíces se prolongó 10.5 cm como máximo después de la fase de inducción 70 días y subcultivos en medio MS50/100 sin RCV 200 días.

Sin embargo el tratamiento I (ANA 0.5 mg/L) tuvo un mayor promedio de elongación 3.23 cm, a diferencia del tratamiento C (TDZ 0.5 mg/L) con un promedio de elongación del 0.1 cm, este promedio se relaciona a que el 50 % de los explantes se oxidaron.

En los tratamientos A (0/0 mg/L), E (ANA 0.1 mg/L), F (0.1/0.1 mg/L), G (0.1, 0.5 mg/L), H (0.1/1 mg/L), I (ANA 0.5 mg/L), J (0.5/0.1 mg/L) y L (0.5/1 mg/L) se desarrolló la formación de velamen, siendo mayor en el tratamiento I (ANA 0.5 mg/L), el velamen era esponjoso y cristalino de color blanco y se presentó siempre en la parte del corte, el velamen se desarrolló después de 100 días del subcultivo en medio sin RCV (Fig. 11-C y 11-E).

Las raíces que se alargaron fueron cambiando de color entre rojo-morado, esto ocurrió en algunos explantes del tratamiento E (ANA 0.1 mg/L) después de 100 días en medio sin RCV (Fig. 11-D).

En explantes de raíz de los tratamientos E (ANA 0.1 mg/L) y el I (ANA 0.5 mg/L) la elongación también se presentó sin el velamen esponjoso, pero con un color entre verde y blanco, después de 100 días del subcultivo en medio sin RCV (Fig. 11-F).

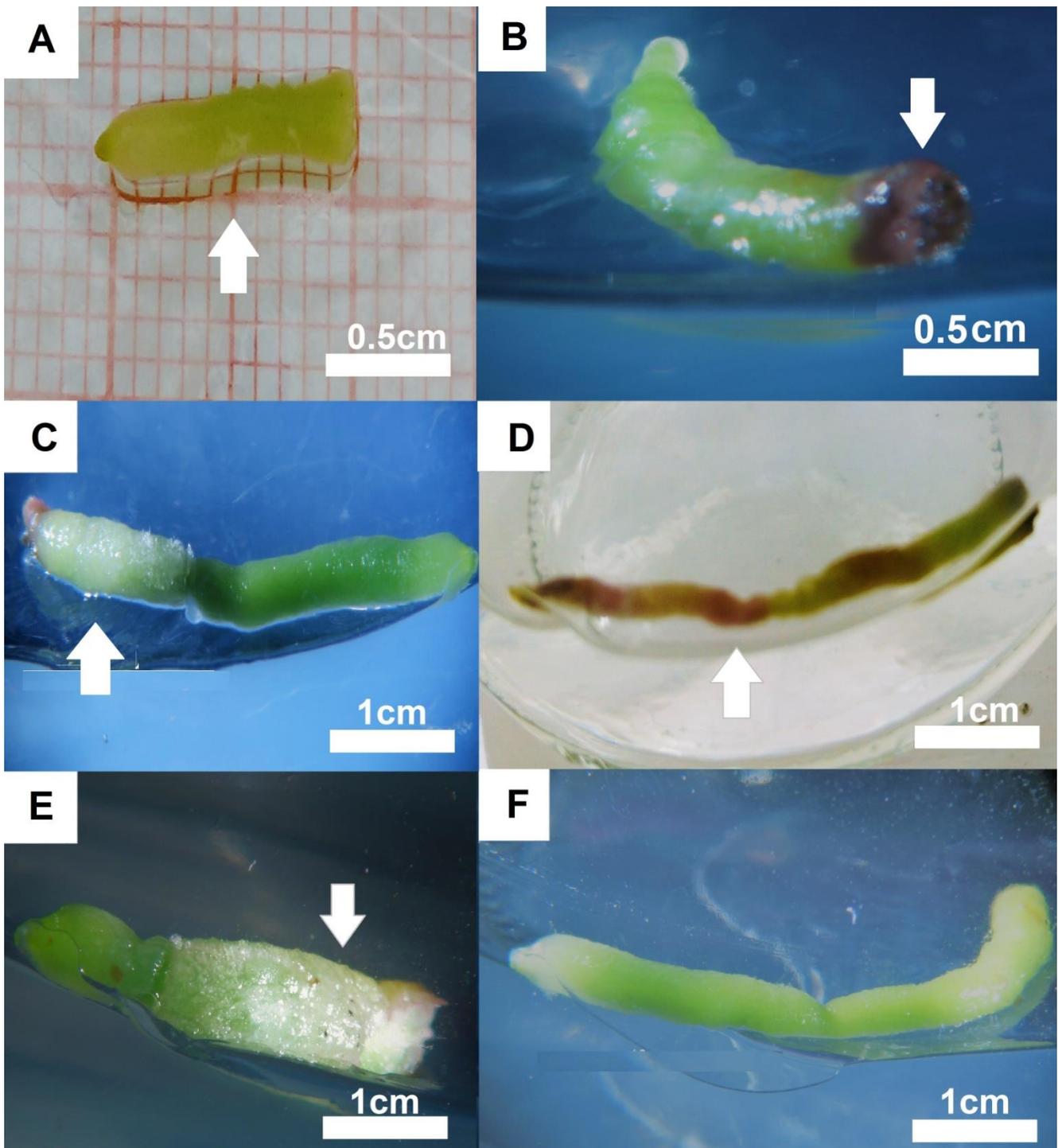


Fig. 11 Respuestas morfogénicas de cultivos de raíz. Después de 70 días en inducción y 200 días en medio MS50/100 sin RCV.

Día de siembra *in vitro* de raíz; B) Oxidación en la parte del corte (20 días en medio MS50/100+RCV); C) Crecimiento de velamen esponjoso y cristalino en la parte del corte 70 días en inducción TTO I (ANA 0.5 mg/L); D) crecimiento de raíz después de 70 días de inducción y 200 en medio sin RCV TTO E (ANA 0.1 mg/L); E) Crecimiento de velamen en la parte del corte TTO J (ANA 0.5/TDZ 1 mg/L); F) Elongación de raíz sin velamen esponjoso TTO I (ANA 0.5 mg/L). Abreviaturas-ANA: Acido naftalenacético; mg/L: Miligramos por Litro; TDZ: Tiaziazurón; TTO: Tratamiento.

Gómez (2009) reportó cultivos de ápices de raíz en *L. gouldiana*, donde obtuvo la formación de velamen después de 10 días de inducción en todos sus tratamientos en un barrido hormonal de ANA (0, 0.1, 0.5 mg/L) y BA (0, 0.5, 1 mg/L), el velamen es una cubierta esponjosa de células epidérmicas muertas que le sirve a la orquídea en la naturaleza para absorber mejor la humedad de la lluvia, rocío, neblina y minerales para ser aprovechados en el interior de la raíz, sin embargo en los ápices de raíz de *L. gouldiana* se desarrolló el velamen por la humedad *in vitro* presente en los envases. En el presente estudio en los cultivos de raíz de *L. albida* en todos los explantes sobrevivientes de todos los tratamientos se desarrolló velamen, en el tratamiento I (ANA 0.5 mg/L) se desarrolló la mayor cantidad de velamen esponjoso y cristalino, en este mismo tratamiento se desarrolló el mayor porcentaje de elongación (3.23 cm). Gómez indicó que la elongación no está asociada a la presencia de RCV ya que obtuvo explantes elongados en cultivos libres de reguladores, la máxima elongación fue de 11.5 cm en medio MS50/100 sin RCV, en el tratamiento control de *L. albida* la máxima elongación fue de 5 cm.

En los cultivos de raíces de *L. albida* del presente estudio, la máxima elongación se obtuvo en un explante del tratamiento K (0.5/0.5 mg/L) su máxima elongación fue de 10.5 cm, sin embargo el promedio de elongación de este tratamiento fue de 1.45 cm.

Gómez (2009) también reportó en ápices de raíz de *L. gouldiana* el 90 % de oxidación en el tratamiento control y el 95 % en medio MS50/100 + BA 0.5 mg/L, en *L. albida* hubo un mayor porcentaje de oxidación del 50 % en el tratamiento C (TDZ 0.5 mg/L). Gómez indicó que posiblemente la oxidación se debió a que las citocininas estimulan la síntesis de compuestos fenólicos.

6.6 Establecimiento *ex vitro*.

6.6.1 Establecimiento *ex vitro* de plántulas germinadas y desarrolladas *in vitro*.

Las plantas provenientes de semillas, multiplicadas con la citocinina BA, se aclimatizaron en 3 diferentes mezclas de sustratos (tratamientos) y después de 100 días se obtuvieron los datos de supervivencia, teniendo un mayor porcentaje en el tratamiento 3 con el 90 %. En el tratamiento 2 la supervivencia fue del 85 % y siendo el de menor supervivencia el tratamiento 1 con el 75 % (Tabla 21).

Tabla 21 Porcentajes de supervivencia de la aclimatización de plantas de *L. albida* provenientes de semillas germinadas y multiplicadas *in vitro* en 3 diferentes mezclas de sustratos (tratamientos), después de 100 días de ser establecidas *ex vitro*.

Tratamiento	Sustrato	Partes	Supervivencia (%)
1	Corteza-Agrolita-Tepojal	(1:1:1)	75
2	Corteza-Tepojal	(2:1)	85
3	Corteza-Agrolita	(2:1)	90

Los cultivos de plantas de *L. albida*, contenían CA, las plantas se observaban vigorosas, con hojas verdes, tallos verdes, raíces verdes y blancas, algunas con velamen, en algunos frascos habían 10 plántulas (Fig. 12-A) y en otros 20 a 30 plántulas (Fig. 12-B), de las cuales fueron seleccionadas aquellas que midieran más de 3 cm, con 3 ó más hojas y 3 ó más raíces (Fig. 12-C).

La mezcla del tratamiento 1 estaba compuesta por sustratos estériles de Corteza, Agrolita y Tepojal en partes iguales (1:1:1) (Fig. 12-D), después de 100 días de ser sembradas las plantas de *L. albida* en esta mezcla sobrevivió el 75 %, el 25 % de las que sucumbieron durante el transcurso de la aclimatización fue por la pudrición de las hojas, tallos y raíces, consecuencia de la retención y poca drenaje de agua de los sustratos (Fig. 12-G), las primeras plantas que comenzaron a pudrirse se observaon el día 20 y así continuaron hasta el día 100.

Tratamiento 2, la mezcla estaba compuesta por sustrato estéril de Corteza y Tepojal en partes iguales (1:1) (Fig. 12-E), el 85 % de las plantas sobrevivieron y el 15 % de las plantas que sucumbieron fue por consecuencia de la deshidratación de las hojas, tallos y raíces por la poca retención de agua (Fig. 12-H).

Tratamiento 3, la mezcla estaba compuesta por sustrato estéril de Corteza y Agrolita en partes iguales (1:1) (Fig. 12-F), está mezcla resultó un poco más eficaz que en los tratamientos 1 y 2, la supervivencia fue del 90 % y después del transcurso de los 100 días, las plantas sobrevivientes se encontraban verdes y con las raíces más fuertes que se adherían al sustrato (Fig. 12-I).

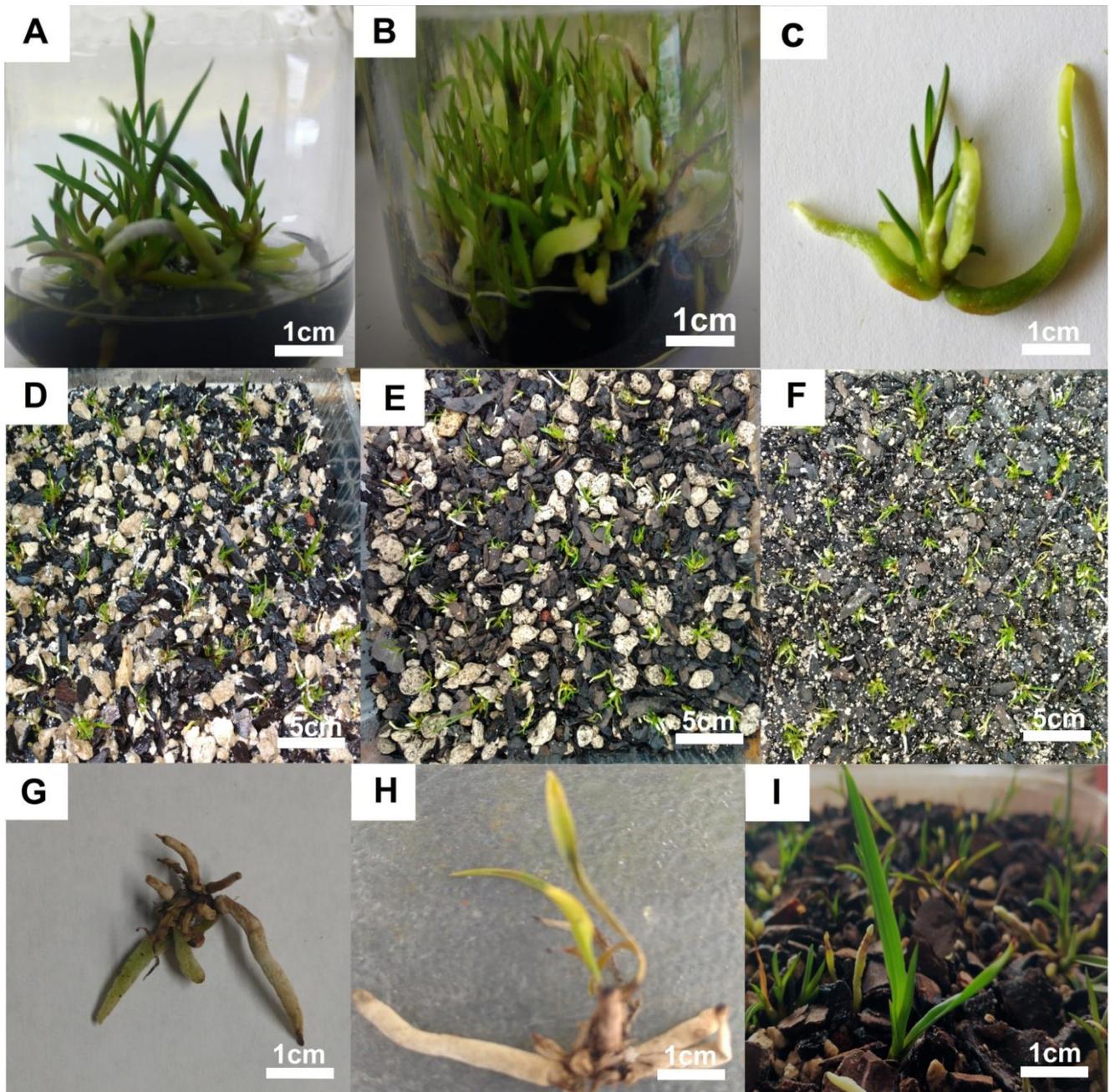


Fig. 12 Aclimatización de *L. albida*.

A) Plántulas provenientes de semillas en CA, 360 días; B) Frasco con plántulas de *L. albida* antes de ser aclimatizadas; C) Plántula para aclimatizar con 7 hojas y 4 raíces; D) Tratamiento 1: Corteza, Tepojal y Agrolita (1:1:1); E) Tratamiento 2: Corteza y Tepojal (2:1); F) Tratamiento 3: Corteza y Agrolita (2:1); G) Plántula muerta por exceso de agua, tratamiento 1 (100 días de aclimatización); H) Plántula muerta por deshidratación, tratamiento 2 (100 días de aclimatización); I) Plántula viva y establecida *ex vitro* Tratamiento 3, (100 días de aclimatización).

6.6.2 Establecimiento *ex vitro* de plántulas regeneradas en cultivos de tallos.

Para la aclimatización se utilizaron plantas que provenían de la regeneración de los cultivos de tallo con los RCV ANA/TDZ, los sustratos estériles utilizados fueron corteza y agrolita en 2:1 partes, después de 100 días de aclimatización se logró el 91.45 % de supervivencia (Fig. 13).



Fig. 13 Plántulas aclimatizadas, 100 días, provenientes del cultivos de tallo.

Para lograr la aclimatización de *L. albida* el tratamiento con mayor supervivencia (90 %) fue el número 3 (corteza y agrolita 2:1 partes) después de 100 días de ser evaluadas las plántulas regeneradas con BA. Fue por ello que las plantas regeneradas de los tallos con RCV, ANA y TDZ, se aclimatizaron con esta misma mezcla de sustratos, obteniendo un 91.45 % de supervivencia.

La corteza como sustrato es bueno para plantas epifitas según Raya (2013), quien aclimatizó *L. halbingeriana* en corteza de encino obteniendo un 80 % de supervivencia y concluyó que es un sustrato adecuado para la aclimatización.

La agrolita ha sido utilizada en diferentes estudios para la aclimatización de *Laelias*, Sierra (2009) reportó la aclimatización de *L. autumnalis* en agrolita y sphagnum (2:1) obteniendo un 63.33 % de supervivencia. Gómez (2008) con Peat moss y agrolita (3:1) logró aclimatizar plántulas de *L. gouldiana* con un 98.7 % de supervivencia, Ordóñez (2015) con la mezcla de sustrato corteza de pino, tepezil y carbón vegetal. (1:1:1) obtuvo un 78.10 % de supervivencia en *L. superbiens*.

En el tratamiento con menor supervivencia (75 %) fue el 1 donde la mezcla estaba compuesta por corteza, agrolita y tepojal (1:1:1 partes), la principal causa de que las plantas no logaran la aclimatización al 100 % fue el poco drenaje que ocurrió en el contenedor y esto como consecuencia

provocó un exceso de humedad y la proliferación de hongos en los primeros 10 días, además de la pudrición en raíces. Posiblemente este resultado concuerda con lo que Gómez (2009) indicó en *L. gouldiana* los riegos deben ser de manera espaciada ya que la planta es bien adaptada al estrés hídrico y no tolera la humedad.

En el tratamiento 2 donde la mezcla fue de corteza y tepojal (2:1 partes), las raíces se deshidrataban rápidamente, posiblemente esto se debió a que la mezcla de ambos sustratos no retenían la humedad suficiente. En una mezcla de tezontle y corteza de encino (1:1) Ávila y Salgado (2005) reportaron en *L. speciosa* un 98 % de supervivencia, después de dos años de monitorear plantas aclimatizadas, sin embargo la aclimatización de cada especie de *Laelia* será diferente por las condiciones de las plantas sembradas en *ex vitro*, los cuidados y atenciones que se hacen en cada experimento.

7. Conclusiones.

Con el método de TTZ se determinó que las semillas de *L. albida* eran poco viables, y al germinar las semillas en medios nutritivos *in vitro* se pudo confirmar la poca viabilidad teniendo porcentajes menores a 1 % en los lotes 1 y 2 después de 100 días de iniciados los cultivos.

En el lote 1 de semillas para el establecimiento aséptico se utilizó el método de la jeringa (10 % NaClO V/V durante 10 minutos) resultó efectivo porque después de 100 días de la siembra *in vitro* no se presentó ningún tipo de contaminación en el medio de cultivo.

En los medios de cultivo MS50/100 y KC, las semillas lograron germinar con promedios muy bajos debido a la poca viabilidad de éstas, sin embargo para el desarrollo de las plántulas germinadas el medio MS50/100 presentó plántulas de mayor tamaño después de 100 días de la siembra *in vitro*.

Al utilizar el RCV BA (0.1 mg/L por 30 días de inducción) se logró estimular el crecimiento y la multiplicación de las plántulas provenientes de semillas, obteniendo un promedio 5 brotes/plántula en el lote 1 y 6 brotes/plántula en el lote 2 vía organogénesis directa.

En los cultivos de tallo, después de 70 días de inducción y 200 días en medio MS50/100 sin RCV, resultó que el mejor tratamiento de regeneración fue el J (0.5 mg/L ANA y 0.1 mg/L TDZ) teniendo una media de 15.3 brotes/explante vía organogénesis directa.

En los cultivos de raíz se obtuvo como respuesta morfogénica después de 70 días de inducción y 200 días en medio MS50/100 sin RCV la elongación de la raíz, siendo en el tratamiento I (0.5 mg/L ANA) el que mayor promedio tuvo de 3.23 cm/ tratamiento.

Después de 100 días de aclimatización de *L. albida* la mezcla de sustratos: corteza y agrolita (2:1 partes), fue la que favoreció la supervivencia del 90 % en plántulas provenientes de la germinación y desarrollo *in vitro*, y el 91.45 % de supervivencia en plántulas provenientes de cultivos de tallos.

8. Bibliografía.

- ☠ Abdenour E. A. y Vicent E. J. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos. CATIE 38p.
- ☠ Aguilar M. M. A. y López E. A. L. 2013. Germinación *in vitro* de *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr., una herramienta para su conservación *ex situ*. Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas. Paper 5: 18-24pp.
- ☠ Alcalde M. T. 2007. Glosario de novedades cosméticas. Sustancias y términos más comunes. *Ámbito farmacéutico Cosmética*. 26 (7): 76-82pp.
- ☠ Álvaro A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana* 20 (1): 153-175pp.
- ☠ Anaya L. A. M. 2007. Ecología química. Ed. Plaza y Valdez. México 349 p.
- ☠ Angeles E. A., Valencia B. A. J., Virgen C. G., Ramírez S. C., Paredes G. L. and Hurtado D. S. 2012. Micropropagation of agave (*Agave tequilana* Weber. var. Azul) through axillary buds. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15: 693-698pp.
- ☠ Arditti J. 1966. Orchids. *Scientific American* 204 (1) 70-78pp.
- ☠ Arditti J. 1982. Orchid seed germination and seedling culture: A Manual. In: Arditti J. (ed.). *Orchid biology: Reviews and perspectives*. Ithaca: Comstock publishing associates 2:244-370pp.
- ☠ Arditti J. 1992. *Fundamentals of orchid biology*. John Wiley and Sons. U.S.A. 691p.
- ☠ Arditti J. 1996. Orchid micropropagation: The path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators. *Botanical Journal of the Linnean Society* 122:183-241pp.
- ☠ Arditti J. y Ghani A. K. 2000. Tansley Review No. 110. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytol.* 145(3): 367-421pp.
- ☠ Ávila D. I. y Salgado G. R. 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Biológicas*. 8: 138-149pp.
- ☠ Ávila D. I., Oyama K., Carlos G. A. C. y Salgado G. R. 2009. *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 99: 335-343pp.
- ☠ Bello B. J. J., García G.G. y Iglesias A. L. 2015 *In vitro* conservation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) under slow growth conditions. *Rev. Fitotec. Mex.* 38 (2): 165–171pp.
- ☠ Beltrán C. M.C. y Martínez B. J. I. 1996. Orquídeas medicinales en la flora cubana. *Natura Medicatrix* 43: 42-43pp.
- ☠ Bermúdez C., Rodríguez M., Reyes M., Gómez K. R., Chong P. B. y Rivero L. 2016. Mutagénesis *in vitro* en suspensiones celulares embriogénicas de banano cv. Grande naine (*Musa AAA*). *Bioteología Vegetal* Vol. 16, No. 2: 103–111pp.

- ☠ Buentello V. B. y Sánchez H. S. G. 1998. Efecto del estímulo por sacarosa y manitol al inicio de la germinación de semillas de *Laelia speciosa* (H. B. K.)Schltr. Tesis de biología. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. 57p.
- ☠ Carmona R. I. A. 2016. Propagación y reintroducción de algunas orquídeas terrestres de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, en un pedregal en restauración dentro de la Ciudad Universitaria. Tesis de Biología. FES Zaragoza UNAM. 70p.
- ☠ Castañeda Z. M. 2008. Propagación y conservación del Lirio de Todos los Santos *Laelia anceps* Lindl. subs. *anceps* f. *semialba* (Orchidaceae) a través del cultivo de tejidos. Tesis de Biología. Universidad Veracruzana. Facultad de Biología. 101p.
- ☠ Cazarez F. T. L., Graciano L. J. J., Solís G. S., Díaz R. B., Nájera L. J. A. y Montoya A. J. B. 2016. Propagación *in vitro* de la orquídea *Prosthechea citrina* (La Llave & Lex.) W. E. Higgins nativa del estado de Durango, México Investigación y Ciencia, Vol. 24, No. 67, 19-25pp.
- ☠ Chemisquy M. A. 2010. Las orquídeas del género *Gavilea* Poepp: sistemática, taxonomía, biogeografía y conservación. Universidad de Buenos Aires, 364p.
- ☠ Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP). 2016. México Áreas Naturales Protegidas. Fecha de publicación 12-diciembre-2016. 12p.
- ☠ Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP). 2018. <https://www.biodiversidad.gob.mx/region/areasprot/enmexico.html>. consultado 8.diciembre.2018.
- ☠ Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad. (CONABIO). 2009. Biodiversidad Mexicana. http://www.biodiversidad.gob.mx/biodiversidad/que_es.html consultado 12.abril. 2017.
- ☠ Contreras L. F. 2016. Desarrollo de métodos de propagación *in vitro* de Alcaparro (*Capparis* spp.). Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Vegetal. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 109p.
- ☠ Convenio sobre la diversidad biológica. 1992. Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). Nairobi. Kenia 30p.
- ☠ Cortés S. C. X. 2006. Efecto del estímulo de fructosa durante el proceso de germinación de semillas de *Laelia speciosa* (H. B. K.) Schltr. Tesis de Biología. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM. 73p.
- ☠ Davies J. P. 2010. Their nature, occurrence and function. In Davies J.P. (ed). Plant Hormones: biosynthesis, signal transduction, action!. 3rd edition. Springer. 1-15pp.
- ☠ De la Rosa C. M de L., Domínguez R. M. S., Pérez R. M. E. y Pérez M. B. E. 2012. Cultivo y propagación *in vitro* de cactáceas amenazadas del género *Turbinicarpus*. Interciencia, Vol. 37, No. 2, 114-120pp.

- ☠ Dressler R. L. 1981. The Orchids, Natural history and classification. Cambridge, Massachusetts. 352p.
- ☠ Dressler R. L. 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. Dioscorides Press. Portland, Oregon 313p.
- ☠ Espejo S. A., García C. J., López F. A., Jiménez, M. R. y Sánchez S. L. 2002. Orquídeas del Estado de Morelos. Orq. (Méx.) Vol.16, 332p.
- ☠ Espinosa D. y Ocegueda S. 2008. El conocimiento biogeográfico de las especies y su regionalización natural, en Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México. 33-65pp.
- ☠ Fay M. y Clemente M. 1997. Aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos en la propagación y conservación de especies amenazadas. Monograf. Jardín Botánico Córdoba, 5:43-50pp.
- ☠ Ferl R. y Paul A. L. 2000. Genome organization and expression. En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. USA: American Society of Plant Physiologists. 312-357pp.
- ☠ Flores H. L. F. 2011. El género *Laelia*: Importancia y conservación. Tesina de Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM. 77p.
- ☠ Francisco N. J. J., Jiménez A. A. R., De Jesús S. A., Arenas O. M. L., Ventura Z. E. y Evangelista L. S. 2011. Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de *Laelia eyermaniana* Rchb. f. generadas *in vitro*. Polibotánica. 32: 107-117pp.
- ☠ Gaba P. V. 2005. Plant growth regulators in plant tissue culture and development. En Trigiano R. N. y Gray D. J. (eds). Plant development and biotechnology. CRC press. USA. 87-101pp.
- ☠ Gamborg O. L., Miller R. A. y Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research. 50: 151-158pp.
- ☠ Gamborg O. L., Murashige T., Thorpe T. A. y Vasil I. K. 1976. Plant tissue culture media. *In vitro* 12: 473-478pp.
- ☠ García C. J., Sánchez S. L. M., Jiménez M. R. y Solano G. R. 2003. Flora del bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 119. Herbario AMO México, D. F. 178p.
- ☠ George E. F. 1993. Propagation by Tissue Culture. Part. 1: The Technology. 2^a ed. Exegetics Ltd., UK. 574p.
- ☠ George E. F. and Sherington P. D. 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics Ltd. Eversley, Basingstone, England. 709p.
- ☠ George E. F. y Debergh P. C. 2008. Micropropagation: Uses and Methods. En: George E. F., Hall M. A. y De Klerk G. J. (Eds.). Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 1: The Background. 3ra Edición. Springer. Netherlands 29-64pp.

- ☠ George E. F., Hall M. A. y Klerk G. J. 2008. Plant propagation by tissue culture. 3ra Ed. Springer. Dordrecht. 501p.
- ☠ Gómez M. H. A. 2009. Cultivo *in vitro* de *Laelia gouldiana* Rchb. f. (Orchidaceae), especie endémica de México, extinta en la naturaleza. Tesis de Biología. Facultad de ciencias UNAM. 133p.
- ☠ Hágsater E., Soto A. M. A, Salazar C. G. A., Jiménez M. R., López R. M. A. y Dressler R. L. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, A.C., México, D.F 303p.
- ☠ Hágsater E., Soto A. M. A., Salazar C. G. A., Jiménez M. R., López R. M. A. y Dressler R. L. 2015. Las orquídeas de México. Productos farmacéuticos, S. A. de C. V. Instituto Chinoín. México. 302p.
- ☠ Halbinger F. y Soto A. 1997. *Laelias* of México. Revista del herbario AMO Vol. 15. México D.F. 160p.
- ☠ Harrison M. J. and Arditti J. 1978. Physiological changes during the germination of *Cattleya auriantica* (Orchidaceae). Botanical Gazette 139 (2): 180-189pp.
- ☠ Hempfling T. y Preil W. 2005. Application of a temporary immersion system in mass propagation of *Phalaenopsis*. En: Hvoslef-Eide, A. K. y Preil, W. (Eds.). Liquids Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation. Springer. Netherlands. 231-242pp.
- ☠ Huerta E. H. M. 2014. Evaluación del efecto del cambio de uso del suelo en la distribución de las especies mexicanas de *Laelias* (Orchidaceae). Tesis de Geografía. Facultad de Filosofía y Letras. Colegio de Geografía UNAM. 133p.
- ☠ Iriondo A. J. M. 2001. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas (Revisión). Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg. Vol. 16(1). 24p.
- ☠ Karol C. H., Mosquera E. A. T. y Otero O. J. T. 2015. Propagación *in vitro* de semillas de la orquídea *Comparettia falcata* Poepp. & Endl. (Orchidaceae) mediante técnicas simbióticas y asimbióticas. Acta Agronómica. 64 (2), 125-133pp.
- ☠ Knudson L. 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. Bot. Gaz. 73: 1-25pp.
- ☠ Knudson L. 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seed. American Orchid Society Bulletin 15: 214-217pp.
- ☠ Lascuráin M., List R., Barraza L., Díaz E., Gual F., Maunder M., Dorantes J., Luna V. 2009. Conservación de especies *ex situ*, en Capital natural de México, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio. Conabio, México, 517-544pp.
- ☠ Lecoufle M. 2006. Orquídeas. Ed. Omega. Barcelona, España. 160p.
- ☠ Lee E. H. E., Laguna C. A., Murguía G. J., Elorza M. P., Iglesias A. L., García R. B., Barredo P. F. A. y Santana B. N. 2007. Regeneración *in vitro* de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*. Revista UDO Agrícola. 7(1): 58-67pp.

- ☠ Lewandowski V. 1991. Rooting and acclimatization of micropropagated *Vitis labrusca* “Delaware”. HortScience. 26(5): 586-589pp.
- ☠ Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA). 2012. Diario Oficial de la Federación el 28 de enero de 1988, cámara de diputados del H. Congreso de la unión Secretaría General Secretaría de Servicios Parlamentarios Dirección General de Servicios de Documentación, Información y Análisis. Texto vigente. Última reforma publicada DOF 04-06-2012. 114p.
- ☠ Lozano K. G. A. 2014. Propagación *in vitro* de café (*Coffea arabica*) -variedad Lempira- a partir de meristemas. Proyecto especial de graduación para obtener el título de Ingeniero Agrónomo. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras. 23p.
- ☠ Martínez R. D., Urrea A., Jiménez E. y Atehortua L. 2016. Estrategia para la propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Biotecnología Vegetal Vol. 16, No. 3, 131–142pp.
- ☠ Maya R. G. 2010. Sistemas de apareamiento y tasa de exo-cruzamiento de *Laelia speciosa* (HBK) Shcltr (Orchidaceae) en poblaciones sujetas a diferente grado de perturbación. Tesis de Biología, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán 72pp.
- ☠ Medina I. R. H. y González F. X. J. 2014. Organogénesis directa *in vitro* de *Nicotiana tabacum* -variedad criollo Havanensis- a partir de láminas foliares. Proyecto para obtener el título de Ingeniero Agrónomo, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras. 26p.
- ☠ Menchaca G. R. A., Lozano R. M. A. y Sánchez M. L. 2012. Strategies for the sustainable harvesting of Mexican Orchids. Rev. Mex. Cient. For. Vol. 3. No. 13. 9-16pp.
- ☠ Moreno E. M. 1984. Análisis Físico y Biológico de Semillas Agrícolas. UNAM. México. 383pp.
- ☠ Murashige T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue culture. Physiology Plant, 15: 473-497pp.
- ☠ Nahuat D. S. L. 2001. Embriogénesis somática en tres especies de orquídeas: *Cattleyopsis lindenii*, *Myrmecophila tibicinis* y *Laelia rubescens*. Tesis de Doctorado. Instituto Tecnológico de Mérida. 111p.
- ☠ Nahuat D. S. L., Giorgana F. J. L. y Santana B. N. 2001. Efecto de diferentes antioxidantes en el control de la fenolización en el cultivo *in vitro* de orquídeas. IX Congreso nacional de biotecnología y bioingeniería CXII-25
- ☠ Norma Oficial Mexicana-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. Jueves 30 de diciembre 2010. Segunda sección. 70p.

- ☠ Ordóñez D. J. E. 2015. Propagación *in vitro* de la flor de la Candelaria *Laelia superbiens* Lindl (Orchidaceae). Tesis de Biología. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 149p.
- ☠ Ortíz M. M. V. 2001. Viabilidad de las semillas de tres especies de orquídeas del Valle de Tehuacán, Puebla, bajo condiciones de almacenamiento. Tesis de Biología. Facultad de estudios Superiores Iztacala UNAM. 69p.
- ☠ Otero J. T., Ackerman J. D. y Bayman P. 2002. Diversity and host specificity of mycorrhizal fungi from tropical orchids. *Am. J. Bot.* 89:1852-1858pp.
- ☠ Pacheco R. F. C. 2015. Micropropagación de tres variedades de Nopal (*Opuntia ficus-indica* (L) Miller). Tesis para obtener título de Ingeniero en Agrobiología. Universidad Nacional Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México. 64p.
- ☠ Park S., Muthy H. y Paek K. 2003. Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. *Plant Science* 167:919-923pp.
- ☠ Pérez E. M., Ramírez R., Nuñez H. y Ochoa N. 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México. 16-39pp.
- ☠ Pérez S. J., Reyero S. R., Pozos R. Y., Verastegui V. M. y Ortiz M. J. G. 2017. Propagación *in vitro* de *Pinguicula moranensis* H.B.K., var. Neovolcánica Z. *Revista Bio Ciencias* 4(3): 179-188pp.
- ☠ Pillco T. H. C. y Quezada P. J. Á. N. 2017. Effect of thidiazuron and indole-butyric acid in the *in vitro* propagation of two varieties of strawberry (Oso Grande and Sweet Charlie) from foliar sections. *Journal of the Selva Andina Research Society*. Bolivia. 69-82pp.
- ☠ Potisek, M. C., Sarmiento, M. y Puc, L. N. 1996. Germinación de semillas y su establecimiento *in vitro* de *Laelia rubescens* Lindley y *Epidendrum stamfordianum* Batem. Reporte Anual de Ciencia y Tecnología INIFAP. CIRSURESTE. Campeche. México. 187-192pp.
- ☠ Pritchard H. W. 1989. Modern methods in orchid conservation: The role of physiology, ecology and management. Cambridge University Press. Cambridge. 173p.
- ☠ Rittershausen B. y Rittershausen W. 2004. Growing orchids, successful gardening indoors and out. Londres, UK, Southwater. 256p.
- ☠ Roca W. M. y Mroginski L. A. (eds.) 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia 970p.
- ☠ Rodríguez S. C. M. 2016. Inducción de embriones somáticos de *Bougainvillea glabra* Choise. Tesis para obtener título de Maestría en ciencias en desarrollo de productos Bióticos. IPN. 63p.
- ☠ Romero T. R., Luna R. B. S. y Álvarez B. A. 2007. Uso de complejos comerciales como sustitutos de componentes del medio de cultivo en la propagación *in vitro* de *Laelia anceps*. LANKESTERIANA Universidad de Costa Rica. 7(1-2): 353-356pp.

- ☠ Salazar M. S. A. 2012. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling formation of *Cattleya mendelii* Dombrain (Orchidaceae). ACTA AGRONÓMICA. 61 (1), 67-76pp.
- ☠ Salazar, C. G. A.; Reyes, S. J.; Brachet, C. y Pérez, C. J. 2006. Orquídeas y otras plantas nativas de la Cañada, Cuicatlán, Oaxaca, México. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 175p.
- ☠ Sánchez C. N. y Jiménez V. M. 2010. Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos Tropicales. Agronomía mesoamericana 21(1): 193-205pp.
- ☠ Santos H. L. 2002. Estimación de la variabilidad genética de la orquídea *Laelia albida* en el Valle de Zapotitlán de Salinas Puebla. Tesis de Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM. 87p.
- ☠ Santos H. L., Martínez G. M., Campos, J. E. y Aguirre L. E. 2005. *In vitro* propagation of *Laelia albida* (Orchidaceae) for conservation and ornamental purposes in Mexico. HortScience. 40(2): 439-442pp.
- ☠ Sarabia O. M. E., Ávila D. I., Carlos G. A. y Salgado G. R. 2010. Callus growth and plant regeneration in *Laelia speciosa* (Orchidaceae). Lankesteriana. 10(1): 13-18pp.
- ☠ Sarukhán J., Carabias J., Koleff P., Urquiza-Haas T. 2012. Capital Natural de México: Acciones y estrategias para su valoración y recuperación. CONABIO. México 99p.
- ☠ Seaton P. y Ramsay M. 2005. Growing Orchids from seed. Royal Botanic. Gardens, Kew London, England 82p.
- ☠ Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2013. Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave y de Desempeño Ambiental. Edición 2012. México. 361p.
- ☠ Sharry S., Adema M y Abedini W. 2015. Plantas de probeta: manual para la propagación por Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial de la Universidad de la Planta. Buenos Aires, Argentina 233p.
- ☠ Sierra J. H. J. 2006. Germinación *in vitro* y adaptación a condiciones *ex vitro* de *Laelia autumnalis* (La Llave y Lexarza) Lindl. (Orchidaceae). Tesis de Biología. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM. 117p.
- ☠ Slater A., Scott N. y Fowler M. 2003. Plant biotechnology. The Genetic Manipulation of Plants. Oxford University Press, Oxford. 36-53pp.
- ☠ Soto A. M. A. 2006. La vainilla: retos y perspectivas de su cultivo. CONABIO 66: 1-9pp.
- ☠ Soto A. M. A. y Salazar, G. A. 2004. Orquídeas. En: García Mendoza, A. J., Ordóñez, M. J. y Briones-Salas, M. (Comps.). Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología, UNAM, Fondo

- oaxaqueño para la conservación de la naturaleza y World Wild Found, México, D. F. México. 271-295pp.
- ☠ Soto A. M. A., Hágsater E., Jiménez R., Salazar G. A., Solano R., Flores R. y Contreras E. I. 2007. Las orquídeas de México: catálogo digital. Instituto Chinoín, A.C., México, D.F.
 - ☠ Téllez V. M. A. A. 2011 Análisis del diagnóstico de la familia Orchidaceae en México. Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México. 169p.
 - ☠ Terán M. M. D. y Cuesta C. Y. 2012. Análisis del desarrollo de la orquídea del género *Dendrobium* sp, en cuatro (4) cortezas de árboles, cativo (*Prioria copaifera*), camajón (*Sterculia apetala* (jacq.) H. Kars), olleto (*Lecythis minor jacq*) y cedro (*Cedrela odorata*), en la sede administrativa del parque nacional natural los Katios, en el municipio de Turbo Antioquia – Colombia. Escuela De Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente Programa: Tecnología Agroforestal Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD) Cead – Turbo.
 - ☠ Thorpe T. A. 1998. Morphogenesis and Regeneration. En Indra K. Vasil y Trevor A. Thorpe (eds.). Plant Cell and Tissue culture. Kluwer Academia Publishers, Dordrecht Holanda 17-36pp.
 - ☠ Tinoco J. M. S. 2006. Adquisición de competencia para la micropropagación de *Stanhopea tigrina*, *Laelia anceps*, *Epidendrum veroscriptum* y *Cattleya x esbetts* (Orchidaceae). Tesis de Biología. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM. 127p.
 - ☠ Tirado, J. M., Naranjo, J. y Atehortúa L. 2005. Propagación *in vitro* de *Phalaenopsis* (Orchidaceae) a partir de protocormos, mediante el Sistema de inmersión temporal “RITA”. Revista Colombiana de Biotecnología. 7(1): 25-31pp.
 - ☠ Torres J. y Mogollón N. 2000. Micropropagación de *Cattleya mossiae* Parker ex Hook Mediante brotación axilar inducida por Tidiazurón. Biagro 12(1): 10-14pp.
 - ☠ Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). 2017. The UICN List of theated species version 2016-3 www.iucnredlist.org Downloader on 24. March.2017.
 - ☠ Vázquez V. S. 1994. Cambios Morfológicos, anatómicos y fisiológicos en plantas aclimatizadas de Anturio y Orquídeas. Tesis de Maestría de Colegio de Postgraduados. 77p.
 - ☠ Velasco O. L. y Beltrán B. P. 2008. Orquídeas de la serranía de Grazalema. Segunda edición. Consejería de medio ambiente. Junta de Andalucía Sevilla. 270p.
 - ☠ Velázquez V. R. 1997. Desarrollo y crecimiento de plántulas de *Laelia speciosa* (H. B. K.) Schltr. Cultivadas *in vitro*. Tesis de biología. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza 63p.
 - ☠ Vergara G. J., Aguirre C. F., Castillo E. P., Arroyo M. A., López E. A. L., Villalobos M. R. y Estrada S. S. 2010. Micropropagation and vasorelaxant activity of *Laelia autumnalis* (Orchidaceae). Natural Product Research. 24(2): 106-114pp.

- ☠ Villafuerte S. A. 2013. Micropropagación de *Barkeria whartoni* y *Barkeria scandens* (Orchidaceae), especies mexicanas en peligro de extinción. Tesis de Biología. Facultad de Ciencias UNAM. 145p.
- ☠ Villalobos V. M. y Thorpe T. A. 1991. Micropropagación, conceptos, metodologías y resultados. En Roca W. M. y Mroginski (Eds). Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. CIAT. Cali, Colombia.127-141pp.
- ☠ Villaseñor J. L y Ortiz E. 2014. Biodiversidad de las plantas con flores (División Magnoliophyta en México. Revista Mexicana de Biodiversidad. Supl. 85: 134-142pp.
- ☠ Villaseñor J. L. 2003. Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México. Interciencia 28: 160-167pp.
- ☠ Villaseñor J. L. 2016. Checklist of the native vascular plants of Mexico. Revista Mexicana de Biodiversidad 87 559-902pp.
- ☠ Yih N. C. and Mohd S. N. 2011. *In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchid through formation of protocorm-like bodies. Plant Cell Tiss Organ Cult 105:193–202pp.

9. Apéndice 1.

El medio de cultivo MS50/100 es una modificación del medio Murashige Skoog (1962), el cual contiene 50 % de sales inorgánicas y 100 % de compuestos orgánicos (Tabla 22), fue adicionado con 30 g/L de sacarosa y se ajusta a un pH de 5.7.

El medio semisólido MS50/100 después de ajustar el pH, se agregaron como gelificante 3.8 g/L de Gellam Gum y se vertió en frascos de vidrio (Gerber®, 125 ml) con 20 ml cada uno. Los frascos con medio de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 1.5 kg/ cm² durante 17 minutos.

Tabla 22 Composición del medio de cultivo MS50/100.

Solución stock	Componente	Gramos/Litro	MS50/100
1 Solución Macronutrientes	Nitrato de amonio-(NH ₄)NO ₃	1.65	50 %
	Nitrato de potasio-KNO ₃	1.9	
	Sulfato magnésico-MgSO ₄ *7H ₂ O	0.37	
	Fosfato de potasio monobásico- KH ₂ PO ₄	0.17	
2 Solución	Cloruro de calcio dihidratado-CaCl ₂ 2H ₂ O	0.44	
3 Solución Micronutrientes	Sulfato de manganeso monohidratado- MnSO ₄ *H ₂ O	0.01689	
	Sulfato de Zinc heptahidratado-ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0.0086	
	Ácido bórico-H ₃ BO ₃	0.0062	
	Yoduro de potasio-KI	0.00083	
	Molibdato sódico dihidratado-Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0.00025	
	Sulfato de cobre pentahidratado- CuSO ₄ *5H ₂ O	0.000025	
	Cloruro de cobalto hexahidratado- CoCl ₂ *6H ₂ O	0.000025	
4 Solución	Sulfato ferroso heptahidratado-FeSO ₄ 7H ₂ O	0.0278	
	Na ₂ EDTA	0.0373	
5 Solución Vitaminas	Tiamina *HCl	0.0001	100 %
	Ac. Nicotínico	0.0005	
	Piridoxina *HCl	0.0005	
6 Solución	Inositol	0.10	
7 Solución Aminoácidos	Glicina	0.002	

10. Apéndice 2.

El medio Knudson C (1946) (Tabla 23), fue adicionado con 20 g/L de sacarosa, ajustado a un pH de 5.5.

El medio semisólido KC se gelificó con 3.8 g/L de Gellam Gum, y fue vertido en frascos de vidrio (Gerber®, 125 ml) con 20 ml cada uno.

Los frascos con medio de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 1.5 kg/ cm² durante 17 minutos.

Tabla 23 Composición del medio de cultivo Knudson C.

Solución Stock	Componente	Gramos/Litro
1 Solución	Nitrato de calcio-Ca(NO ₃) ₂ * 4H ₂ O	1
2 Solución	Sulfato de amonio-(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
Macronutrientes y Micronutrientes	Fosfato monopotásico ácido-KH ₂ PO ₄	0.25
	Sulfato de magnesio-MgSO ₄ *7 H ₂ O	0.25
	Sulfato de manganeso-MnSO ₄ *H ₂ O	0.075
3 Solución	Sulfato ferroso-FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0.025
4 *Solución Vitaminas	Tiamina *HCl	0.0001
	Ac. Nicotínico	0.0005
	Piridoxina *HCl	0.0005

*La solución 4 de vitaminas, es una modificación del medio Knudson C, que estimula el crecimiento y la brotación múltiple en protocormos de orquídeas.