

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**

ENSEÑAR LA EXPLOTACIÓN DE LA TIERRA, NO LA DEL HOMBRE

**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA  
INSTITUTO DE HORTICULTURA**

**PROPAGACIÓN *IN VITRO* Y CARACTERIZACIÓN  
MOLECULAR DE ORQUÍDEAS EPÍFITAS MEXICANAS**

**TESIS**

QUE COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA**

PRESENTA:

**GEORGINA FLORES ESCOBAR**

Chapingo, Estado de México, octubre de 2008



DIRECCION GENERAL ACADEMICA  
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES  
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



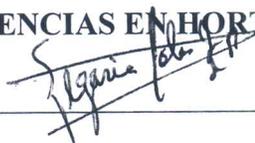
Instituto de Horticultura

**PROPAGACION *IN VITRO* Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE  
ORQUÍDEAS EPÍFITAS MEXICANAS**

Tesis realizada por **Georgina Flores Escobar** bajo la dirección del Comité Asesor  
indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito para obtener el grado de:

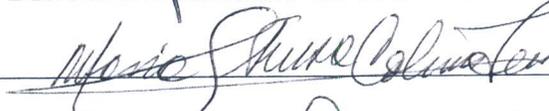
**DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA**

DIRECTOR:



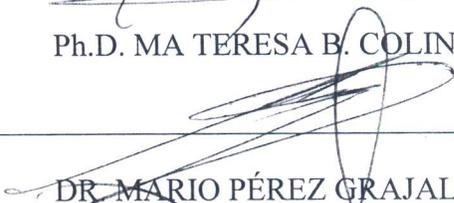
DR. JUAN PORFIRIO LEGARIA SOLANO

ASESOR:



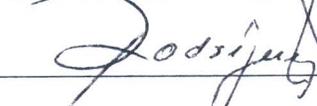
Ph.D. MA TERESA B. COLINAS LEÓN

ASESOR:



DR. MARIO PÉREZ GRAJALES

ASESOR:



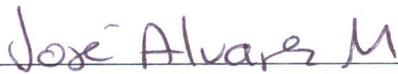
DR. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O

ASESOR:



DR. MARTIN MATA ROSAS

LECTOR  
EXTERNO:



DR. JOSÉ GUADALUPE ÁLVAREZ MOCTEZUMA

## **DEDICATORIA**

A la memoria de mi madre Zenona Escobar Santa María, quien con su ejemplo ante las adversidades forjó mi carácter y tenacidad, siendo mí guía.

Gracias por darme la vida.

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Chapingo** por ser mi Alma Mater.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo financiero para llevar a cabo mis estudios de doctorado.

Al **Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT)** por el financiamiento otorgado para realizar parte de la investigación.

Al **Departamento de Preparatoria Agrícola** por permitirme continuar con mi superación académica.

A **mi comité asesor** por aceptar formar parte del mismo, en especial al **Dr. Juan P. Legaria Solano** por permitirme realizar el presente trabajo bajo su dirección, por la disposición mostrada en la revisión y por todas las observaciones realizadas al mismo para mejorarlo; a la **Ph. D. Ma. Teresa B. Colinas León** por las correcciones realizadas al presente trabajo, en especial al escrito en inglés.

A **mis compañeros de trabajo**, en especial a Gil por todo el apoyo recibido y sus observaciones para mejorar el trabajo de laboratorio; a Bastida por su gran ayuda en el trabajo de laboratorio, de campo y el invaluable apoyo recibido durante mis estudios de doctorado; a Erik por sus observaciones, apoyo y amistad; a Hilario su gran ayuda.

A **mis compañeros de doctorado** por el apoyo recibido en el transcurso del mismo, en especial a Toñita y Josesito por los lazos de amistad formados.

A **todos aquellos** que de una u otra forma participaron en la conclusión del presente trabajo.

## **DATOS BIOGRÁFICOS**

La autora del presente trabajo nació en la ciudad de Texcoco, Estado de México el 9 de marzo de 1958. Los estudios de Preparatoria y Licenciatura los realizó en la Universidad Autónoma Chapingo, en el Departamento de Preparatoria Agrícola y Departamento de Bosques consecutivamente en el periodo 1977 - 1984 y obtuvo el título de Ingeniero Agrónomo especialista en Bosques. Trabajó en la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos en el estado de Veracruz, en el periodo 1984-1988, impartió diversas asignaturas en el Centro de Estudios Tecnológicos de Perote, Veracruz. Ingresó como académico a la Universidad Autónoma Chapingo en el año 1988. Realizó estudios de Maestría en la División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma Chapingo en el periodo 1991- 1993. Ingresó al Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo en el año 2004, donde realizó estudios de Doctorado en Horticultura.

# PROPAGACIÓN *IN VITRO* Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ORQUÍDEAS EPÍFITAS MEXICANAS

## *IN VITRO* PROPAGATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF MEXICAN EPHIPHYTIC ORCHIDS

Georgina Flores Escobar<sup>1</sup> y Juan P. Legaria Solano<sup>2</sup>

### RESUMEN

En México existe gran cantidad de orquídeas, su número se estima entre 1106 y 1400 especies y subespecies. Clasificadas en diferentes categorías de riesgo: una especie probablemente extinta (E); 18 especies en peligro de extinción (P); 58 especies amenazadas (A) y 110 especies sujetas a protección especial (Pr). Se establecieron las mejores condiciones de cultivo *in vitro* para la propagación de *Oncidium stramineum* y *Brassia verrucosa*. Se definió la variabilidad genética de una población de vainilla de la región de Papantla, Veracruz e identificó molecularmente a 26 especies de orquídeas y detectó la variación intra e interespecífica de *Encyclia hanburyi*, *Encyclia citrina*, *Encyclia polybulbon*; *Laelia autumnalis*, *Laelia speciosa*; *Leochilus carinatus*; *Lemboglossum aptera*; *Oncidium stramineum*, *Oncidium sphacelatum* y *Oncidium cavendishianum* con marcadores moleculares tipo RAPD. El medio de cultivo MS suplementado con 30 g·litro<sup>-1</sup> de sacarosa y 6.5 g·litro<sup>-1</sup> de agar, 100 ml·litro<sup>-1</sup> de agua de coco, 40 g·litro<sup>-1</sup> de extractos de manzana, plátano y jitomate, 2.0 g·litro<sup>-1</sup> de peptona y 200 mg·litro<sup>-1</sup> de polivinil pirrolidona (PVP) fue el óptimo para el desarrollo de plántulas de *Oncidium stramineum*; El mejor desarrollo de las plántulas de *Brassia verrucosa* se obtuvo en el medio de cultivo MS suplementado con 100 ml·litro<sup>-1</sup> de agua de coco, 40 g·litro<sup>-1</sup> de extractos de manzana, plátano y jitomate, 2.0 g·litro<sup>-1</sup> de peptona y 1.0 g·litro<sup>-1</sup> de carbón activado. La población de vainilla presentó polimorfismo de 67.5 %. Se determinó la huella genética de las 26 especies de orquídeas. La mayor diversidad genética se presentó en *Encyclia citrina* con un valor de 58.17 % y la menor en *Lemboglossum aptera* con un valor de 35.6 %. *Laelia speciosa* presentó un valor de polimorfismo intermedio, de 56.7 %.

**Palabras clave:** Cultivo *in vitro*, RAPD, Huella genética.

<sup>1</sup> Tesista

<sup>2</sup> Director

### ABSTRACT

In Mexico exists a great amount of orchids, its number is considered between 1106 and 1400 species and subspecies. Classified in different categories of risk: one probably extinct species (e); 18 species in danger of extinction (p); 58 threatened species (a) and 110 subject species to special protection (Pr). The culture medium for the *in vitro* germination of the seeds and development of seedlings of *Oncidium stramineum* and *Brassia verrucosa* were determined. Also, the molecular characterization of a population of vainilla from Papantla, Veracruz region was made and the molecular identification of 26 species of orchids was made and detected the interspecific variation of *Encyclia hanburyi*, *Encyclia citrina*, *Encyclia polybulbon*; *Laelia autumnalis*, *Laelia speciosa*; *Leochilus carinatus*; *Lemboglossum aptera*; *Oncidium stramineum*, *Oncidium sphacelatum* and *Oncidium cavendishianum* with molecular markers type RAPD. MS culture medium supplemented with 100 ml·liter<sup>-1</sup> of coconut water, 40 g·liter<sup>-1</sup> organic extracts from tomato, apple and banana, 2.0 g·liter<sup>-1</sup> peptone and 200 mg·liter<sup>-1</sup> polyvinyl pyrrolidone was adequate for the development of *Oncidium stramineum* seedlings; the best development of *Brassia verrucosa* seedlings was obtained in MS culture medium supplemented with 100 ml·liter<sup>-1</sup> of coconut water, 40 g·liter<sup>-1</sup> organic extracts from tomato, apple and banana, 2.0 g·liter<sup>-1</sup> peptone and 1.0 g·liter<sup>-1</sup> activated charcoal. The vanilla population presented polymorphism of 67.5 %. The genetic fingerprint of 26 species of orchids was determined. *Encyclia citrina* presented the greater genetic diversity (58.17 %) and *Lemboglossum aptera* (35.6 %) presented the minor. *Laelia speciosa* presented an intermediate polymorphism, of 56.7 %.

**Key words:** *In vitro* tissue, RAPD, Genetic fingerprint.

<sup>1</sup> Thesis autor

<sup>2</sup> Thesis director

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
Agradecimientos .....	iv
Datos Biográficos .....	v
Resumen General .....	vi
General Abstract .....	vi
Introducción General .....	1
Propagación <i>in vitro</i> de <i>Oncidium stramineum</i> Lindl.....	4
Resumen .....	5
Abstract .....	7
Introducción .....	9
Materiales y Métodos .....	11
Resultados .....	14
Discusión .....	19
Conclusiones .....	22
Literatura citada .....	23
Propagación <i>in vitro</i> de la orquídea <i>Brassia verrucosa</i> (Bateman ex Lindl.)....	26
Resumen .....	27
Abstract .....	28
Introducción .....	29
Materiales y Métodos .....	30
Resultados .....	34
Discusión .....	36
Conclusiones .....	37
Literatura citada .....	38
Caracterización molecular de una población de vainilla ( <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews) de Papantla, Veracruz.....	41
Resumen .....	42
Abstract .....	43
Introducción .....	44
Materiales y Métodos .....	47
Resultados y Discusión .....	52
Conclusiones .....	60
Literatura citada .....	61
Variación molecular de diversas especies de orquídeas mexicanas.....	64
Resumen .....	65
Abstract .....	66
Introducción .....	67
Materiales y Métodos .....	69

Resultados y Discusión	.....	74
Conclusiones	.....	85
Literatura citada	.....	86
Discusión general	.....	89
Conclusiones generales	.....	92

## ÍNDICE DE CUADROS

		Pág.
Cuadro 1.	Análisis de varianza para número de brotes, longitud y ancho de hoja, número y longitud de raíces y altura de plántula en la reproducción <i>in vitro</i> de <i>Oncidium stramineum</i> .....	16
Cuadro 2.	Comparación de medias para número de brotes, longitud de hoja, ancho de hoja, número y longitud de raíces y altura de plántula para tres medios de cultivo durante la reproducción <i>in vitro</i> de <i>Oncidium stramineum</i> .....	16
Cuadro 3.	Correlaciones entre las variables longitud de hoja, ancho de hoja, número y longitud de raíces y altura de plántula en los medios de cultivo para la reproducción <i>in vitro</i> de <i>Oncidium stramineum</i> ....	18
Cuadro 1.	Análisis de varianza para número de brotes (NB), longitud y ancho de hoja (LH y AH), número y longitud de raíces (NR, LR) y altura de plántula (AP) en la reproducción <i>in vitro</i> de <i>Brassia verrucosa</i> .....	35
Cuadro 2.	Comparación de medias para número de brotes, longitud de hoja, ancho de hoja, número y longitud de raíces y altura de plántula para tres medios de cultivo durante la reproducción <i>in vitro</i> de <i>Brassia verrucosa</i> .....	35
Cuadro 1.	Soluciones utilizadas para cargar y teñir geles de agarosa.....	50
Cuadro 2.	Lista de iniciadores analizados, sus secuencias, número de productos amplificados, y polimorfismo total.....	53
Cuadro 3.	Valores Eigen y varianza acumulada obtenida del análisis de Componentes Principales de patrones de bandas RAPD's de vainilla ( <i>Vanilla planifolia</i> ) de Papantla, Veracruz, México.....	55
Cuadro 4.	Vectores propios de cuatro componentes principales (CP) procedentes de patrones de bandas RAPD de 22 genotipos de <i>Vanilla planifolia</i> .....	59
Cuadro 1.	Soluciones utilizadas para cargar y teñir geles de agarosa.....	72
Cuadro 2.	Lista de iniciadores analizados, sus secuencias, número de productos amplificados y polimorfismo total en los géneros: <i>Encyclia</i> , <i>Laelia</i> , <i>Lemboglosum</i> ( <i>Rhynchostele</i> ), <i>Leochilus</i> y <i>Oncidium</i> .....	80
Cuadro 3.	Lista de iniciadores analizados, sus secuencias, número de productos amplificados y polimorfismo total en las especies estudiadas del género <i>Encyclia</i> : <i>Encyclia hanburyi</i> (Eh), <i>Encyclia citrina</i> (Ec) y <i>Encyclia polybulbon</i> (Ep).....	81

Cuadro 4.	Lista de iniciadores analizados, sus secuencias, número de productos amplificados y polimorfismo total en las especies estudiadas del género <i>Oncidium</i> : <i>Oncidium stramineum</i> (Os), <i>Oncidium sphacelatum</i> (Of) y <i>Oncidium cavendishianum</i> (Oc).....	82
Cuadro 5.	Lista de iniciadores analizados, sus secuencias, número de productos amplificados y polimorfismo total en las especies estudiadas del género <i>Laelia</i> : <i>Laelia autumnalis</i> (La) y <i>Laelia speciosa</i> (Ls).....	83
Cuadro 6.	Lista de iniciadores analizados, sus secuencias, número de productos amplificados y polimorfismo total en <i>Lemboglossum aptera</i> ( <i>Rhynchostele aptera</i> ).....	83
Cuadro 7.	Lista de iniciadores analizados, sus secuencias, número de productos amplificados y polimorfismo total en <i>Leochilus carinatus</i> .....	84

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Flor y planta adulta de <i>Oncidium stramineum</i> .....	11
Figura 2.	Etapas del desarrollo <i>in vitro</i> de <i>Oncidium stramineum</i> . A, imbibición; B, semillas verdes; C, germinación; D, Protocormo inicial; E, Protocormo tardío; F, desarrollo de hojas; G, desarrollo de raíces verdaderas; H, plántula.....	15
Figura 3.	Dinámica de las variables: A, Ancho de la hoja; B, Longitud de la hoja; C, Número de raíces; D, Longitud de raíz; E, Altura de plántula, durante el desarrollo <i>in vitro</i> .....	17
Figura 1.	Planta adulta de <i>Brassia verrucosa</i> en floración.....	30
Figura 2.	Medios de cultivo utilizados para la propagación <i>in vitro</i> de <i>Brassia verrucosa</i> .....	32
Figura 3.	Germinación de semillas de <i>Brassia verrucosa</i> .....	34
Figura 1.	Planta y flor de vainilla ( <i>Vanilla planifolia</i> ) en estado natural, en Papantla, Veracruz, México.....	47
Figura 2.	Patrones de bandeo resultantes de la prueba de 12 iniciadores.....	50
Figura 3.	Calidad del ADN genómico purificado de secciones de brotes de vainilla ( <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews 1808) de Papantla, Veracruz, México.....	52
Figura 4.	Diferentes grados de polimorfismo en patrones de productos de amplificación en vainilla ( <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews 1808) de Papantla, Veracruz, México.....	53
Figura 5.	Dendrograma construido mediante el coeficiente de similitud de Jaccard con los patrones de bandas RAPD's obtenido de 22 genotipos de secciones de brotes de vainilla ( <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews 1808) provenientes de Papantla, Veracruz, México.....	56
Figura 6.	Dendrograma construido a partir de 1000 combinaciones de remuestreo obtenido de los productos RAPD's de 22 genotipos de secciones de brotes ( <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews 1808)...	57
Figura 7.	Componentes principales obtenidos de 22 genotipos de secciones de brotes de vainilla ( <i>Vanilla planifolia</i> ) provenientes de Papantla, Veracruz, México.....	58
Figura 1.	Plantas de orquídeas mexicanas estudiadas.....	71
Figura 2.	Patrones de banda tipo RAPD de 26 especie de orquídeas mexicanas estudiadas.....	74
Figura 3.	Diferentes grados de polimorfismo en patrones de productos de amplificación en los géneros estudiados.....	75

Figura 4. Dendrogramas contruidos mediante el coeficiente de Jaccard con los patrones de bandas RAPD obtenido de orquídeas mexicanas de los géneros A: *Enciclya* (*Eh*, *Ec* y *Ep*), B: *Laelia* (*La*, *Ls*), C: *Leochilus* (*Lc*), D: *Oncidium* (*Os*, *Oc*, *Of*) y E: *Lemboglossum* (*Rhynchosteale*) (R) .....

77

## INTRODUCCIÓN GENERAL

En México existe gran cantidad de orquídeas, su número se estima entre 1106 y 1400 especies y subespecies, agrupadas en 159 géneros, aunque aún no se ha concluido la labor de inventariar las orquídeas mexicanas, por lo que el número puede ser superior. La mayor diversidad se ubica en las regiones situadas al sur del Trópico de Cáncer, desde las costas del Pacífico y del Golfo, en altitudes que pueden rebasar los 3, 500 metros (Espejo y López-Ferrari, 1998; Soto, 1998; Hágsater *et al.*, 2005). El 60 % de las orquídeas mexicanas se concentra principalmente en los bosques de niebla, que ocupan sólo el 1 % del territorio nacional. Los estados de la Republica Mexicana que cuentan con mayor diversidad de orquídeas son Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Guerrero, Morelos, Jalisco, Michoacán, Quintana Roo, Puebla, Nayarit, Tlaxcala y San Luis Potosí (Téllez, 2005; Hágsater *et al.*, 2005). Las orquídeas se encuentran clasificadas en diferentes categorías de riesgo: una especie probablemente extinta (E); 18 especies en peligro de extinción (P) de las cuales 4 son endémicas; 58 especies amenazadas (A) con 24 endémicas y 110 especies sujetas a protección especial (Pr) con 41 endémicas (SEMARNAT, 2002). Una de las características más interesantes de esta familia es su alta proporción de especies endémicas. Se han registrado 444 especies o subespecies que corresponden aproximadamente al 40 % del total de taxa en el país (Espejo *et al.*, 2002; Soto, 1996). Lo anterior convierte a la Orchidaceae en una de las familias más ricas en endemismos entre los países de América tropical. Sin embargo, la alteración y destrucción de su hábitat, así como la extracción ilegal de orquídeas silvestres para su

comercio indiscriminado, hace que varias especies de orquídeas mexicanas estén consideradas en peligro de extinción (Hágsater *et al.*, 2005).

Aunado a lo anterior, las orquídeas presentan serios problemas para su propagación en forma natural debido, entre otros factores, a la baja tasa de fertilización de los óvulos y a la escasa diferenciación de la semilla (Pierik, 1990), que requiere condiciones climáticas y bióticas particulares para su germinación, y sólo entre 2 y 5 % germina (Arditti y Lawrence, 1964); muchas especies de orquídeas son capaces de crecer sólo en presencia de un hongo simbiótico muy particular (Rasmussen, 1989). La interrelación de hongo y orquídea al menos durante las etapas de germinación y desarrollo temprano de las plantas es esencial (Cabañas, 1991). Tradicionalmente, las orquídeas se han propagado asexualmente mediante división de plantas; sin embargo, se ha demostrado que es posible obtener un gran número de plantas a partir de la germinación de semillas utilizando métodos de cultivo *in vitro* (Arditti, 1993). Las plantas obtenidas a partir de semillas representan una amplia fuente de diversidad, lo cual puede aplicarse para desarrollar estrategias efectivas de conservación.

En México, la investigación en orquídeas se ha enfocado principalmente a su propagación y a la caracterización morfológica (Castillo y Engleman, 1993); el uso de marcadores moleculares basados en el ADN ha sido reducido, los reportes de estudios moleculares en orquídeas mexicanas se centran principalmente en especies de interés comercial como los realizados por Cibrian (1999), Soto-Arenas (1999, 2006), Schlüter (2002) y Schlüter *et al.* (2007) en vainilla y el de Santos *et al.* (2006) en *Laelia albida*.

Estudios de caracterización molecular en especies de orquídeas mexicanas son de vital importancia para análisis filogenéticos y taxonómicos, mapeo de genomas,

cuantificación de variabilidad génica intra e interespecífica, mejora genética, localización de genes de resistencia a enfermedades, estudios de dispersión de especies, y discriminación entre clones, entre otros.

Con base en lo anterior, los objetivos de la presente investigación fueron:

- a) identificar un medio de cultivo apropiado para la propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. (especie amenazada y endémica de México) y *Brassia verrucosa* Bateman ex Lindl. (especie rara), para su conservación; b) definir la variabilidad genética presente en una población de vainilla de la región de Papantla, Veracruz, y c) determinar la variación genética en los géneros *Encyclia*, *Laelia*, *Oncidium* y 26 especies de orquídeas mexicanas.

## PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *ONCIDIUM STRAMINEUM* Lindl.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Georgina Flores Escobar; Juan Porfirio Legaria Solano; Isaiás Gil Vázquez; María Teresa B. Colinas León. Aceptado para su publicación en la Revista Chapingo. Serie Horticultura.

## RESUMEN

La orquídea epífita *Oncidium stramineum*, desarrolla en bosques de encino y sobre otras especies latifoliadas, se distribuye en los estados de Puebla y Veracruz. La Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 la considera como especie amenazada y endémica de México. Por lo que es urgente su conservación. La semilla es el material de propagación más adecuado cuando se desea conservar la mayor diversidad genética posible. El objetivo fue identificar un medio de cultivo apropiado para la propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. La germinación se realizó en medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS). Para el desarrollo se probaron los medios MS (T1), MS (T2) suplementado con extractos orgánicos, agua de coco, peptona y carbón activado y MS suplementado con extractos orgánicos, agua de coco, peptona y polivinil pirrolidona (T3). La germinación alcanzada fue de 47.69 %. Se observaron siete etapas fenológicas: imbibición a los cuatro días, semillas verdes a los ocho días, germinación a los trece días, protocormo inicial a los dieciséis días, protocormo tardío a los diecinueve días, desarrollo de hojas a los veintiocho días, desarrollo de raíces verdaderas a los treinta y cuatro días y plántula. Las variables número de brotes, longitud de hoja, ancho de hoja, número de raíces y altura de plántula fueron afectadas por los tratamientos, no la longitud de raíces. La comparación de medias de Tukey para las variables número de brotes, longitud de hoja, ancho de hoja, número y longitud de raíces y altura de plántula, mostró diferencias significativas tan solo para las variables número de brotes, longitud de hoja, número de raíces y altura de plántula, no así para ancho de hoja y longitud de

raíces. El comportamiento de las variables evaluadas en función del tiempo mostró que el medio de cultivo (T3) suplementado con extractos orgánicos, agua de coco, peptona y polivinil pirrolidona influyó de manera positiva en el desarrollo, mejorando el tamaño de las hojas y la altura de las plántulas. El mismo medio de cultivo (T3) presentó además significancia en las correlaciones para todas las variables evaluadas. El mejor desarrollo de las plántulas se observó en el medio de cultivo MS suplementado con 100 ml·litro<sup>-1</sup> de agua de coco, 40 g·litro<sup>-1</sup> de extractos de jitomate, manzana y plátano, 2.0 g·litro<sup>-1</sup> de peptona y 200 mg·litro<sup>-1</sup> de polivinil pirrolidona.

Palabras clave: *Trichocentrum stramineum*, epifita, polivinilpirrolidona.

## ABSTRACT

The epiphytic orchids *Oncidium stramineum* developed in oak forest and over tropical trees, it is distributed in the states of Puebla and Veracruz. The Mexican Official Norm NOM-059-ECOL-2001 considers it like threatened and endemic of Mexico. This is the reason why its conservation is urgent. The seed is the most suitable material of propagation to conserve the greater possible genetic diversity. The objective was to identify an appropriate culture medium for in vitro propagation of *Oncidium stramineum* Lindl. The medium for *in vitro* propagation of *Oncidium stramineum* Lindl. was determined. Murashige and Skoog (MS) medium was used for germination, and for growth the MS (T1), MS (T2) medium supplemented with organics extracts, coconut water, peptone and active charcoal and MS supplemented with organics extracts, coconut water, peptone and polivinyl pirrolidone (T3) were tried. Germination was of 47.69 %. Seven phenological stages were observed: imbibition in four days, green seeds in eight days, germination in thirteen days, initial protocorm in sixteen days, late protocorm in nineteen days, developing leaves in twenty eight days, development of true roots in thirty four days and then the seedling stage. The variables number of buds, leaf length, leaf width, number of roots and seedling height were affected by the treatments, but not length of roots. The Tukey analysis showed significant differences in number of buds, leaf length, number of roots and seedling height. The evaluated variables showed that culture medium (T3) supplemented with organic extracts, coconut water, peptone and polivinyl pirrolidone influenced in a positive way leaf width, leaf length and

seedling height. The same culture medium (T3) induced significance in the correlations for all the variables evaluated. The best growth of *Oncidium stramineum* Lindl. seedlings was observed in MS culture medium supplemented with 100 ml.liter<sup>-1</sup> of coconut water, 40 g.liter<sup>-1</sup> organic extracts from tomato, apple and banana, 2.0 g.liter<sup>-1</sup> peptone and 200 mg.liter<sup>-1</sup> polivinyl pirrolidone.

Key words: *Trichocentrum stramineum*, epiphyte, polivinylpirrolidone.

## INTRODUCCIÓN

En México existen poco más de 1 200 especies y subespecies de orquídeas. Las orquídeas. Éstas se ubican al sur del Trópico de Cáncer, desde las costas del Pacífico y del Golfo, en altitudes que pueden rebasar los 3, 500 metros (Espejo y López-Ferrari, 1998; Hágsater *et al.*, 2005; Soto, 1998). Una de las características más interesantes de esta familia es su alta proporción de especies endémicas. Se han registrado 444 especies o subespecies que corresponden aproximadamente al 40 % del total de taxa en el país (Espejo *et al.*, 2002). La Orchidaceae es una de las familias más ricas en endemismos entre los países de América tropical. Sin embargo, la alteración y destrucción del hábitat, así como la extracción ilegal de orquídeas silvestres para su comercio, hace que varias especies de orquídeas estén consideradas en peligro de extinción (Hágsater *et al.*, 2005). En los dos últimos siglos se han extinguido varias especies de orquídeas en México y a partir de 1998 han desaparecido al menos 22 (Hágsater *et al.*, 2005). La Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 incluye a la familia Orchidaceae y a todas sus especies como amenazadas y en peligro de extinción (SEMARNAT, 20003). Por otro lado, las orquídeas presentan problemas serios para su propagación en forma natural debido a que la mayor parte de las semillas están escasamente diferenciadas por lo que no se les distinguen los cotiledones ni las radículas y carecen de endospermo (Pierik, 1990). Tradicionalmente, las orquídeas se han propagado asexualmente mediante división de plantas. Sin embargo, se ha demostrado que es posible obtener un gran número de plantas a partir de la germinación de semillas utilizando métodos de

cultivo *in vitro* (Arditti, 1993). El cultivo de tejidos se ha venido utilizando para la producción comercial de orquídeas, principalmente para los generos *Phalaenopsis*, *Oncidium*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, and *Paphiopedilum*, tal es el caso de Taiwán, donde se ha visto incrementada la producción de orquídeas del 51 % en 1998 al 85 % para el año 2000 (Pan, 2007). Diversos factores se han estudiado en la industria para la propagación de *Oncidium*, entre ellos el uso mínimo de medios de cultivo, adición de fitohormonas y otros aditivos como peptona, carbón activado, puré de plátano, entre otros (Ouyang *et al.*, 2006). La orquídea *Oncidium stramineum* se conoce también por los sinónimos *Lophiaris straminea* y *Trichocentrum stramineum* y se denomina comúnmente “oreja de burro blanca”. Es una planta epífita, de crecimiento simpodial que se desarrolla en los bosques de encino y sobre otras especies latifoliadas y se distribuye en los estados de Puebla y Veracruz (Bechtel *et al.*). La Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 la considera como especie amenazada y endémica de México. Por tal motivo es urgente su conservación. La semilla es el material de propagación más adecuado cuando se trata de conservar la mayor diversidad genética posible de una población. Las técnicas de cultivo *in vitro* pueden contribuir a mejorar la germinación. Esta metodología se ha utilizado principalmente para especies e híbridos de interés comercial; sin embargo, existen pocos trabajos donde se ha empleado con especies silvestres. Por tal motivo, el presente trabajo tuvo como objetivo identificar un medio de cultivo apropiado para la propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal.** Se utilizaron semillas de cápsulas indehiscentes de la orquídea *Oncidium stramineum* obtenidas de plantas adultas (figura 1). Las semillas obtenidas se sembraron 35 días después de la colecta de las cápsulas.



**Figura 1.** Flor y planta adulta de *Oncidium stramineum*.

**Medios de cultivo.** El medio de cultivo (T1) utilizado para la germinación fue las sales de Murashige y Skoog (1962) (MS) suplementado con 30 g·litro<sup>-1</sup> de sacarosa, 6.5 g·litro<sup>-1</sup> de agar como agente gelificante; el pH fue ajustado a 5.7±0.1 con NaOH 1N o HCl, antes de la esterilización en autoclave durante 20 minutos a 1.2 Kg cm<sup>-2</sup> de presión y 120 °C de temperatura. Para el desarrollo de las plántulas además del medio de cultivo utilizado para la germinación (T1), se ensayaron los medios de cultivo: a) MS mas 30 g·litro<sup>-1</sup> de sacarosa, 2.0 g·litro<sup>-1</sup> de peptona, 2.0 g·litro<sup>-1</sup> de carbón activado, 40 g·litro<sup>-1</sup> de extractos de manzana, plátano y jitomate los cuales fueron licuados con 100 ml·litro<sup>-1</sup> de agua de coco, adicionándose al medio antes de ajustar el pH a 5.0±0.1 e incorporar 6.5 g·litro<sup>-1</sup> de agar (T2); b) Medio de cultivo similar al anterior sustituyendo el carbón activado por 200 mg·litro<sup>-1</sup> de polivinilpirrolidona (PVP) (T3). La esterilización se llevó a cabo bajo las condiciones antes mencionadas.

**Desinfestación de semillas.** Se pesó en una balanza analítica 0.273 mg de semillas y para la desinfestación se siguió el procedimiento propuesto por Sheehan (1998) el cual consiste en; a) se midió con una pipeta serológica 1.25 ml de NaClO al 5 % (v/v) y se aforó con agua destilada a 25 ml en una probeta graduada; b) se agregaron las semillas a la solución de hipoclorito de sodio mas 2 gotas de Tween 20 cubriendo con papel parafilm y agitando durante 15 segundos hasta que las semillas se tornaron de color amarillo y, c) se colocaron en la campana de flujo laminar, esperando 5 minutos para su posterior siembra.

**Siembra de semillas.** Desinfestadas las semillas, se decantaron en un embudo con papel filtro estéril, enjuagándose 4 veces con agua destilada estéril, procediéndose a realizar la siembra de la forma siguiente: a) con pinzas estériles se tomó el papel filtro depositándolo sobre una caja de petri estéril desdoblándose para exponer las semillas; b) con una microespátula estéril se tomaron las semillas y se distribuyeron uniformemente en el medio de cultivo seleccionado para la germinación (Pierik, 1990). Una vez terminada la siembra, los frascos se cubrieron con papel aluminio después de flamearse para evitar contaminación y finalmente se colocaron en la sala de incubación a una temperatura de  $25 \pm 1$  °C, a fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad y una intensidad lumínica de  $41 \mu\text{Mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  proporcionada por lámparas fluorescentes (luz de día) de 30 W.

**Germinación de semillas.** El porcentaje de germinación se consideró cuando el embrión absorbió agua e incrementó su circunferencia y longitud, llegando a romper la testa y se cuantificó el número de semillas germinadas por centímetro cuadrado, esto mediante la ayuda de una hoja de papel milimétrico.

**Desarrollo de las plántulas.** Una vez germinadas las semillas (fase de protocormo), se seleccionaron los protocormos que midieron de 2 a 3 mm de diámetro y se sembraron 4 explantes por frasco en los medios de cultivo seleccionados para el desarrollo de las plantas. Todo el proceso se llevó a cabo bajo condiciones de asepsia dentro de la campana de flujo laminar, los frascos con los explantes se colocaron en la sala de incubación y se subcultivaron cada treinta días en el respectivo medio de cultivo.

**Desarrollo fenológico.** Se evaluó mediante observaciones al microscopio, tomándose fotografías de cada una de las etapas de desarrollo. Las variables evaluadas fueron: número de brotes (NB), longitud de hoja (LH), ancho de hoja (AH), número de raíces (NR), longitud de raíces (LR) y altura de plántula (AP), las cuales se registraron cada quince días utilizando un vernier (figura 3A, B, C, D y E).

**Diseño del experimento.** El diseño experimental utilizado fue un completamente al azar con tres tratamientos (medios de cultivo) y 30 repeticiones por tratamiento (frascos). La unidad experimental estuvo constituida por cuatro plantas por repetición. Se realizó un total de cuatro evaluaciones durante el experimento.

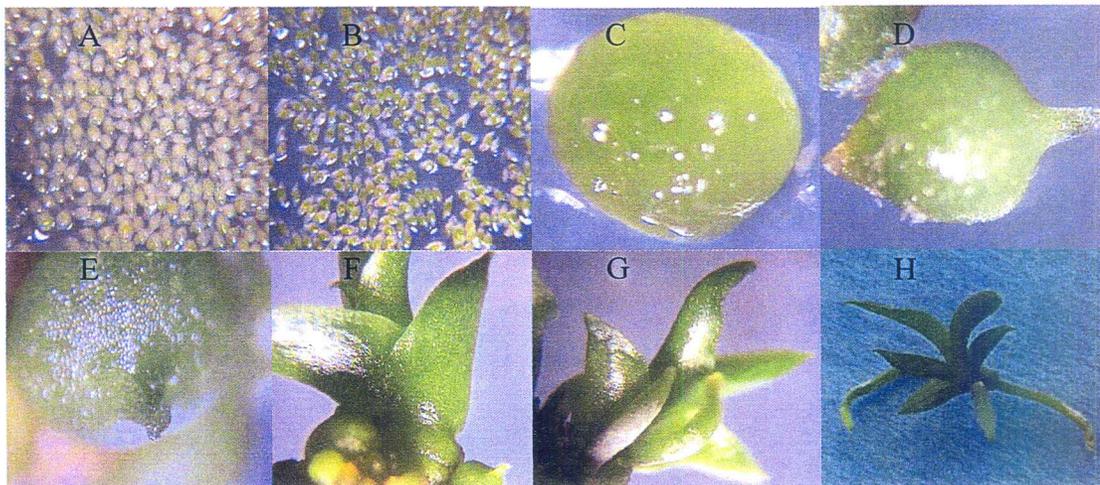
**Análisis de datos.** Con los datos obtenidos de cada variable (NB, LH, AH, NR, LR y AP), se hizo un análisis de varianza. Para los casos que mostraron diferencias significativas se llevó a cabo una prueba de comparación de medias de Tukey a una  $P \leq 0.05$ . Los datos se analizaron con el paquete estadístico SAS versión 8.0 (SAS, 1999).

## RESULTADOS

**Germinación de semillas.** En el presente trabajo el máximo de germinación alcanzado para la especie fue de 47.69 %.

**Etapas fenológicas.** Durante el desarrollo *in vitro* de *Oncidium stramineun* se observaron las siguientes etapas: 1) **imbibición**; a los cuatro días de sembradas las semillas se presentó un hinchamiento pronunciado y una coloración verde pálido del embrión ocasionado por la absorción de agua; ciertos autores (Pierik, 1990; Arditti, 1992; Arditti y Gani, 2000) consideran a ésta como la primer etapa en la germinación de las semillas de orquídeas (figura 2A); 2) **semillas verdes**; a los ocho días, las semillas mostraron una coloración verde muy acentuada y el tamaño de los embriones aumentó hasta en 5 veces (figura 2B); 3) **germinación**; el embrión absorbió agua incrementando su circunferencia y longitud, rompiendo la testa e iniciando la germinación, lo que se manifestó a los trece días (figura 2C), tiempo similar al obtenido por Kalimuthu *et al.* (2007) en la germinación de *Oncidium sp.*; 4) **protocormo inicial**; se formó un complejo de células color verde tenue; se observó la aparición de un primordio foliar de color más intenso formándose estructuras diminutas llamadas rizoides, presentándose esta etapa a los dieciséis días (figura 2D); 5) **protocormo tardío**; el protocormo continuó su desarrollo, incrementando su volumen, desarrollándose por completo y apareciendo en el ápice un primordio foliar, ocurriendo a los diecinueve días después de la siembra (figura 2E); 6) **desarrollo de hojas**; el primordio foliar continuó su desarrollo y el cuerpo del protocormo disminuyó su volumen, completándose el

desarrollo de las hojas, lo cual ocurrió a los veintiocho días (figura 2F); 7) **desarrollo de raíces verdaderas**; el primordio de raíz se desarrolló muy cercano a la base de las hojas en la parte superior del cuerpo del protocormo, presentándose a los treinta y cuatro días después de la siembra (figura 2G); y 8) **plántula**; se incrementó el número de raíces y el cuerpo del protocormo desapareció formándose nuevos brotes (figura 2H).



**Figura 2.** Etapas del desarrollo *in vitro* de *Oncidium stramineum*. A, imbibición; B, semillas verdes; C, germinación; D, protocormo inicial; E, protocormo tardío; F, desarrollo de hojas; G, desarrollo de raíces verdaderas; H, plántula.

#### **Efecto del medio de cultivo en el desarrollo de las plantas.**

El análisis de varianza de los resultados obtenidos (cuadro 1) mostró diferencias significativas entre los tratamientos ( $P \leq 0.05$ ) para las variables número de brotes (NB), longitud de hoja (LH), ancho de hoja (AH), número de raíces (NR) y altura de plántula (AP). La longitud de raíces (LR) no se vio afectada por los medios de cultivo utilizados para el desarrollo de las plantas.

**CUADRO 1.** Análisis de varianza para número de brotes (NB), longitud (LH) y ancho de hoja (AH), número (NR) y longitud de raíces (LR) y altura de plántula (AP) en la propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum*.

F.V.	G.L	NB	LH	AH	NR	LR	AP
Tratamiento	2	2.539*	0.676*	0.014*	5.955*	0.047 <sup>NS</sup>	2.730*
Error	87	34.916	5.061	0.186	9.731	6.087	18.714
Total	89	37.455	5.738	0.200	15.686	6.135	21.444
C.V.		24.576	23.615	17.173	22.337	38.900	25.679

<sup>NS</sup>, \*; No significativo, significativo con  $P \leq 0.05$ .

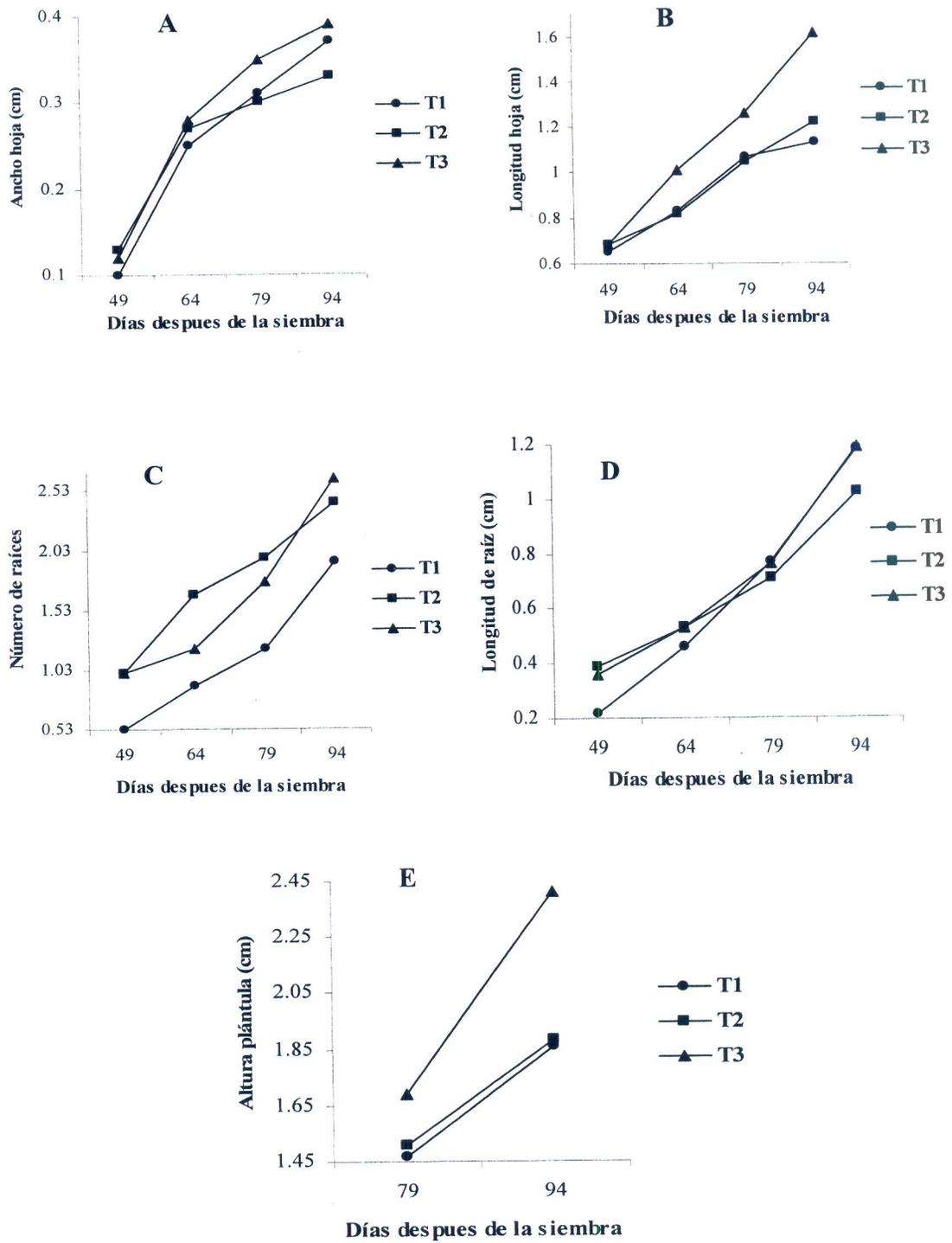
En el cuadro 2 se muestran los resultados de comparación de medias para las variables estudiadas en tres medios de cultivo durante la propagación de *Oncidium stramineum*; sólo las variables AH y LR no mostraron diferencias significativas entre tratamientos.

**CUADRO 2.** Comparación de medias para número de brotes, longitud de hoja, ancho de hoja, número y longitud de raíces y altura de plántula para tres medios de cultivo durante la propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum*.

Tratamiento	NB	LH	AH	NR	LR	AP
1	2.633ba	0.977b	0.260a	1.141b	0.662a	1.666b
2	2.350b	0.944b	0.260a	1.741a	0.665a	1.700b
3	2.750a	1.142a	0.287a <sup>z</sup>	1.608a	0.712a <sup>z</sup>	2.051a
<b>DMS</b>	0.39	0.148	0.028	0.205	0.162	0.285

<sup>z</sup>Medias con la misma letra, dentro de columnas, son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey con  $P \leq 0.05$ ; **DMS**: Diferencia mínima significativa, **NB** Número de brotes, **LH** Longitud de hoja en cm., **AH** Ancho de hoja en cm., **NR** número de raíces, **LR** Longitud de raíces en cm., **AP** Altura de plántula en cm., y **T** tratamiento.

**Dinámica de las variables.** La figura 3 muestra el comportamiento de las variables evaluadas en función del tiempo.



**Figura 3.** Dinámica de las variables: A, Ancho de la hoja; B, Longitud de la hoja; C, Número de raíces; D, Longitud de raíz; E, Altura de plántula, durante el cultivo *in vitro*. Cada punto representa el promedio de 30 repeticiones.

**Correlaciones entre las variables evaluadas.** El cuadro 3 muestra el grado de asociación existente entre las variables evaluadas en los tratamientos.

**CUADRO 3.** Correlaciones entre las variables longitud y ancho de hoja (LH y AH), número y longitud de raíces (NR, y LR) y altura de plántula (AP) en los medios de cultivo para la propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum*.

Medio de cultivo	Variables	AH	NR	LR	AP
T <sub>1</sub>	LH	0.2490 <sup>ns</sup>	0.1235 <sup>ns</sup>	0.4825*	0.3367 <sup>ns</sup>
T <sub>2</sub>		0.6400*	0.2099 <sup>ns</sup>	0.3700*	0.3080 <sup>ns</sup>
T <sub>3</sub>		0.7287*	0.6431*	0.8093*	0.8025*
T <sub>1</sub>	AH		-0.0741 <sup>ns</sup>	0.1849 <sup>ns</sup>	0.0557 <sup>ns</sup>
T <sub>2</sub>			-0.0702 <sup>ns</sup>	0.0906 <sup>ns</sup>	-0.0138 <sup>ns</sup>
T <sub>3</sub>			0.5163*	0.7557*	0.6992*
T <sub>1</sub>	NR			0.5202*	0.8857*
T <sub>2</sub>				0.4719*	0.9303*
T <sub>3</sub>				0.6095*	0.9117*
T <sub>1</sub>	LR				0.8571*
T <sub>2</sub>					0.7624*
T <sub>3</sub>					0.8813*

**LH** Longitud de hoja, **AH** Ancho de hoja, **NR** Número de raíces, **LR** Longitud de raíces y **AP** Altura de plántula. **ns** no significancia estadística  $\alpha \leq 0.05$ . El asterisco (\*) indica significancia con  $\alpha \leq 0.05$  de correlaciones entre las variables indicadas.

## DISCUSIÓN

El máximo de germinación alcanzado para la especie fue de 47.69 %, considerándose un porcentaje de germinación relativamente bajo ya que, de acuerdo con Arditti (1992), los porcentajes de germinación de orquídeas epifitas tropicales alcanzados sobre un medio asimbiótico son mayores a 50 %. Santos *et al.* (2005), por ejemplo, reporta un porcentaje de germinación de 70 a 90 % para *Laelia albida* utilizando el medio de Knudson C, suplementado con extracto de papa. En la regeneración *in vitro* de *Oncidium sp* (Kalimuthu *et al.*, 2007) adicionaron con 2.0 mg/l de BAP al medio MS obteniendo una reproducción satisfactoria.

En el presente trabajo, la baja germinación de las semillas de *Oncidium stramineum* sembradas *in vitro* en el medio MS pudo deberse a factores diversos, entre ellos a que no todas las semillas de una cápsula se forman completamente o son fértiles y sólo germinan las que tienen un embrión viable (Arditti y Ghani, 2000). También, en muchos casos el embrión es muy pequeño con relación a la testa por lo que el volumen de la semilla puede estar ocupado por un 96 % de aire (Arditti, 1992) y la humedad no llega al embrión. Por otro lado, en la germinación de algunas orquídeas influye también la concentración de ABA de las semillas, de tal forma que si su concentración es alta, la germinación es baja. Sin embargo, en comparación con lo que ocurre en la naturaleza, donde germina sólo el 5 % de las semillas producidas y de éstas sólo un porcentaje muy

pequeño alcanza la etapa adulta (Pierik, 1990), el porcentaje de germinación obtenido en este trabajo es satisfactorio.

La adición de extractos orgánicos de plátano, manzana, tomate y agua de coco al medio de desarrollo (T2, T3) para *Oncidium stramineum*, generó diferencia en la respuesta de la variable número de raíces en comparación al medio donde no se adicionaron éstos nutrientes orgánicos (T1). A partir de los 49 días la presencia de raíces es mucho mayor en los medios T2 y T3 con extractos orgánicos que en las plántulas desarrolladas en el medio sin la adición de éstos (T1) (figura 3C). Lo anterior sugiere que agregar extractos orgánicos al medio de cultivo para el desarrollo de plántulas de *Oncidium stramineum* es positivo, sobre todo para la proliferación de raíces. En el caso de *Oncidium stramineum* el uso de carbón activado adicionado al medio para el desarrollo de las plántulas (T2) presentó efecto positivo en las variables; longitud de hoja y número de raíces, comparado con el medio de cultivo de Murashigue y Skoog (T1). Posiblemente debido al efecto que el carbón activado presenta sobre el desarrollo de las plántulas, como lo muestra la figura 3B y C.

Abenavoli y Pennisi (1998) estudiaron el efecto de PVP sobre la formación de callo en *Castanea sativa*, una especie leñosa que produce ácidos insolubles polifenólicos y los excreta al medio induciendo necrosis seguida de la muerte de los explantes. Estos autores encontraron que el uso de polivinil pirrolidona (PVP) incluida en el medio de cultivo para dicha especie redujo el necrosamiento del tejido. También, Pérez *et al.* (2001) utilizaron PVP en el establecimiento y multiplicación de *Leucadendron discolor* para evitar la oxidación. En el presente estudio, la adición de PVP en el medio de cultivo para el desarrollo de *Oncidium stramineum* mostró su efectividad para promover el

crecimiento en varias de las variables estudiadas. Las variables longitud de hoja, ancho de hoja, número de raíces y altura de plántula presentaron un mayor desarrollo en T3 que en los medios de cultivo que carecieron de PVP (T1 y T2) a partir de los 49 días. Lo anterior se observa en las figuras 3A, B, C y E. Por el contrario, para la variable longitud de raíz la diferencia no se apreció con claridad (figura 3D). La mayor efectividad del medio de cultivo adicionado con PVP (T3) en el desarrollo de *Oncidium stramineum* pudo deberse a la mayor capacidad de acción antioxidante de la PVP.

Las correlaciones positivas y significativas encontradas entre las variables evaluadas para el tratamiento T3 dan idea de la adaptación que tendrán las plantas *ex vitro*, ya que a mayor área foliar las plantas tienen una mayor capacidad de producir fotosintatos y con ello desarrollar favorablemente. Las hojas en las orquídeas tienen la función principal de realizar la fotosíntesis y por tanto el contar con una gran superficie foliar expuesta a la luz, sobre todo en lugares sombreados y en situaciones bastante húmedas, es de importancia para el buen desarrollo de la planta (Hågsater *et al.*, 2005). Sirven también de almacenamiento y deben persistir por largo tiempo.

El número y la longitud de las raíces es también favorable para el establecimiento de las plantas fuera del medio de cultivo *in vitro* en el que se han desarrollado. Debido a que las orquídeas epífitas se distinguen por la presencia de raíces aéreas, mismas que utilizan tanto para nutrirse como para anclarse a las plantas hospederas, la correlación encontrada entre las variables número y longitud de raíces es importante porque permitirá una mayor sobrevivencia de *Oncidium stramineum* durante el establecimiento en el invernadero.

## CONCLUSIONES

Con base en los resultados de este trabajo, para la propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* se recomienda utilizar el medio de cultivo MS suplementado con 30 g·litro<sup>-1</sup> de sacarosa y 6.5 g·litro<sup>-1</sup> de agar, 100 ml·litro<sup>-1</sup> de agua de coco, 40 g·litro<sup>-1</sup> de extractos de manzana, plátano y jitomate, 2.0 g·litro<sup>-1</sup> de peptona y 200 mg·litro<sup>-1</sup> de polivinil pirrolidona (PVP).

## LITERATURA CITADA

- ABENAVOLI, M. R.; PENNISI, A.M. 1998. The effect of PVP on chestnut callus formation. *Acta Hort (ISHS)* 457:17-20.
- ARDITTI, J. 1992. *Fundamentals of orchid biology*. Department of Developmental and Cell Biology. Ed. John Wiley and Sons. USA. 691 p.
- ARDITTI, J. 1993. *Micropropagación of orchids*. Ed. John Wiley and Sons. New York. 949 p.
- ARDITTI, J.; GHANI, A. K. 2000. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist* 145 (3): 367-421.
- PAN, CH. L. 2007. Marching Towards the Market: The Business Potential of Agricultural Biotechnology in the Republic of China, pp. 89- 92. *In: Business Potential for Agricultural Biotechnology Products*. Teng, S.P. (ed). The Asian Productivity Organization. Tokio, Japon.
- BECTHEL, H; CRIBB, P; LUANERT, E. 1981. *The Manual of cultivated orchids species*. Ed. Eugen Ulmer GmbH and Co. West Germany. 444 p.

- ESPEJO S. A.; J. GARCÍA C.; A. R. LÓPEZ F.; R. JIMÉNEZ M.; L. SÁNCHEZ S.  
2002. Orquídeas del Estado de Morelos. Herbario AMO. Universidad Autónoma  
Metropolitana-Iztapalapa, México, DF. México. 332 p.
- ESPEJO, S. A.; A. R. LÓPEZ-FERRARI. 1998. Las monocotiledóneas mexicanas una  
sinopsis florística 1. Lista de referencia Parte VII. Orchidaceae I. Consejo  
Nacional de la Flora de México, A.C., Universidad Autónoma Metropolitana-  
Iztapalapa, Consejo Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.  
México, DF. 90 p.
- HAGSATER, E.; M.A. SOTO ARENAS; G.A. SALAZAR CHÁVEZ; R. JIMÉNEZ  
MACHORRO; M.A. LÓPEZ ROSAS; R.L. DRESSLER. 2005. Las orquídeas  
de México. Instituto Chinoin, México, 303 p.
- KALIMUTHU, K; SENTHILKUMAR, R; VIJAYAKUMAR, S. 2007. *In vitro*  
micropropagation of orchid, *Oncidium sp.* (Dancing Dolls). African Journal of  
Biotechnology 6(10): 1171-1174.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A Revised Médium of rapid growth and bioassays  
with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- OUYANG, T. CHEN, S. WANG F.S. 2006. Key Technology study on *Oncidium*  
industrial propagation by tissue culture. *Forest Research* 19 (5): 606-611.

- PÉREZ, F. J.F.; RAVELO, B.J.; RODRÍGUEZ, P. J.A. 2001. *In vitro* establishment and proliferation of axillary bud cultures of *Leucadendron discolor* (Proteaceae). *Acta Horticulturae* 545:179-185.
- PIERIK, R. L. 1990. Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 326 p.
- SANTOS, H.L.; MARTÍNEZ GARCÍA, M.; CAMPOS, J. E.; AGUIRRE L. 2005. *In vitro* Propagation of *Laelia albida* (Orchidaceae) for conservation and ornamental purposes in México. *HortScience* 40(2):439-442.
- SEMARNAT. 2003. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, 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*. 6 de marzo de 2002.
- SHEEHAN, T. J. 1998. Orquídeas. *In*: Introducción a la floricultura. Editor. Larson, A. R. Editorial AGT. Editores S.A. México. 119-146 p.
- SOTO ARENAS, M.A. 1988. Listado Actualizado de las orquídeas de México. *Orquídea (Méx.)* 11:233-276.

**PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE LA ORQUIDEA *BRASSIA VERRUCOSA*  
(BATEMAN EX LINDL.)<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Georgina Flores Escobar; Juan Porfirio Legaria Solano; Isaías Gil Vázquez. Enviado a la Revista Chapingo. Serie Horticultura

## RESUMEN

Se desarrolló una metodología para la propagación *in vitro* de *Brassia verrucosa* Bateman ex Lindl, para lo que se pretendió determinar las mejores condiciones de cultivo para la germinación de las semillas y desarrollo de plántulas, así como una estrategia inicial para su conservación y rescate. La germinación se realizó en medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS), el desarrollo de las plántulas se llevó a cabo en los medios MS (T1), MS suplementado con extractos orgánicos, agua de coco, peptona y carbón activado (T2) y MS suplementado con extractos orgánicos, agua de coco, peptona y ácido giberélico (T3). La germinación fue de 56.70 % y se inició 6 días después de la siembra. Las variables número de brotes, ancho de hoja y longitud de raíces fueron afectadas por los tratamientos, no así la longitud de hoja, número de raíces y altura de plántula. El análisis de medias Tukey mostró diferencias significativas para todas las variables a excepción de ancho de hoja y longitud de raíces. El tratamiento T2 mostró los mayores valores para las variables número de brotes, longitud de hoja, número de raíces y altura de planta. El mejor desarrollo de las plántulas se obtuvo en el medio de cultivo MS suplementado con 100 ml·litro<sup>-1</sup> de agua de coco, 40 g·litro<sup>-1</sup> de extractos de manzana, plátano y jitomate, 2.0 g·litro<sup>-1</sup> de peptona y 1.0 g·litro<sup>-1</sup> de carbón activado.

Palabras clave: *Brassia verrucosa*, peptona, carbon activado.

## ABSTRACT

A methodology for the *in vitro* propagation of *Brassia verrucosa* Bateman ex- Lindl, was developed to determine the best conditions of culture for the germination of seeds and seedling development as well as an initial strategy for its conservation and rescue. The germination was made in Murashige and Skoog (1962) (MS) medium and for seedling growth the MS (T1) medium, MS supplemented with organic extracts, coconut water, peptone and active charcoal (T2) medium and MS supplemented with organic extracts, coconut water, peptone and giberellic acid (T3). A 56.70 % germination was obtained, and it initiated in 6 days. The variables number of buds, leaf width of and length of roots were affected by the treatments, but not leaf length, number of roots and seedling height. The Tukey analysis showed significant differences for all the variables with the exception of leaf width and length of roots. Treatment T2 showed the highest values for the variables number of buds, leaf length, number of roots and seedling height. The best growth of *Brassia verrucosa* was obtained in MS culture medium supplemented with 100 ml·liter<sup>-1</sup> coconut water, 40 g·liter<sup>-1</sup> organic extracts of tomato, apple and banana, 2.0 g·liter<sup>-1</sup> peptone and 1.0 g·liter<sup>-1</sup> activated charcoal.

Key words: *Brassia verrucosa*, peptone, activate charcoal.

## INTRODUCCIÓN

La orquídea *Brassia verrucosa* Bateman ex Lindl., conocida comúnmente como ‘grillitos’ y ‘orquídea araña’, es una planta con hábito de crecimiento epifito, con distribución en Guatemala, Honduras, Venezuela y México en los estados de Hidalgo, Puebla, Veracruz, Oaxaca y Chiapas; desarrolla en bosques de encino y pino así como sobre árboles de sombra en los cafetales a una altitud de 900 a 1 600 metros, con un alto potencial ornamental. Esta especie está siendo amenazada al igual que toda la familia Orchidaceae por la reducción de su hábitat natural debido a la deforestación, cambios de uso de suelo, presencia de incendios, plagas y enfermedades así como por la extracción de su hábitat natural (Hágsater *et al.*, 2005). Por otra parte, la polinización natural, su compleja germinación y sus largos periodos de crecimiento, son factores que también inciden en dicha problemática. El uso de semillas para la germinación *in vitro*, es uno de los componentes más importantes para la conservación y propagación de orquídeas, ya que permite mantener la variabilidad genética de las poblaciones naturales y no solamente clones, como en el cultivo de tejidos. En el presente trabajo se desarrolló una metodología para la propagación *in vitro* de *Brassia verrucosa* Bateman ex Lindl, determinando las mejores condiciones de cultivo para la germinación de las semillas y desarrollo de plántulas, así como una estrategia inicial para su conservación y rescate.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal utilizado.** Se seleccionó la especie *Brassia verrucosa*, cultivada en el orquidario de la Universidad Autónoma Chapingo. Se colectaron cápsulas indehiscentes obtenidas de plantas adultas (Figura 1). Las semillas se extrajeron de las cápsulas y se sembraron 14 días después de la colecta de las cápsulas en el medio de cultivo de Murashige & Skoog (1962).



**Figura 1.** Planta adulta de *Brassia verrucosa* en floración.

**Medios de cultivo.** El medio de cultivo T1 utilizado para la germinación consistió en sales de Murashige y Skoog (1962) suplementado con  $100 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$  de myo-inositol,  $2 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$  de glicina y  $30 \text{ g}\cdot\text{litro}^{-1}$  de sacarosa más  $6.5 \text{ g}\cdot\text{litro}^{-1}$  de agar como agente gelificante; el pH fue ajustado a  $5.7\pm 0.1$  con NaOH 1N o HCl, antes de la esterilización en autoclave durante 20 minutos a  $1.2 \text{ Kg cm}^{-2}$  de presión y  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  de temperatura. Para el desarrollo de las plántulas además del medio de cultivo utilizado para la germinación (T1), se ensayaron los medios de cultivo: a) MS mas  $30 \text{ g}\cdot\text{litro}^{-1}$  de

sacarosa,  $2.0 \text{ g}\cdot\text{litro}^{-1}$  de peptona,  $1.0 \text{ g}\cdot\text{litro}^{-1}$  de carbón activado,  $40 \text{ g}\cdot\text{litro}^{-1}$  de extractos de manzana, plátano y jitomate los cuales fueron licuados con  $100 \text{ ml}\cdot\text{litro}^{-1}$  de agua de coco, adicionándose al medio antes de ajustar el pH a  $5.0\pm 0.1$  e incorporar  $6.5 \text{ g}\cdot\text{litro}^{-1}$  de agar (T2); b) Medio de cultivo similar al anterior sustituyendo el carbón activado por  $3 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$  de ácido giberélico (AG) (T3). La esterilización se llevó a cabo bajo las condiciones antes mencionadas.

**Desinfestación de semillas.** Se pesó en una balanza analítica  $0.375 \text{ mg}$  de semillas, para la desinfestación se procedió de la forma siguiente: a) se midió con una pipeta serológica  $1.25 \text{ ml}$  de  $\text{NaClO}$  al  $5 \%$  (v/v) y se aforó con agua destilada a  $25 \text{ ml}$  en una probeta graduada; b) se agregaron las semillas a la solución de hipoclorito de sodio mas 2 gotas de Tween 20 cubriendo con papel parafilm y agitando durante 15 segundos hasta que las semillas se tornaron de color amarillo y, c) se colocaron en la campana de flujo laminar, durante 5 minutos.

**Siembra de semillas.** Después de desinfectadas, las semillas se decantaron en un embudo con papel filtro estéril, enjuagándose 4 veces con agua destilada estéril, la siembra se realizó de la manera siguiente: a) con pinzas estériles se tomó el papel filtro depositándolo sobre una caja de petri estéril desdoblándose para exponer las semillas, b) con una micro espátula estéril se tomaron las semillas y se distribuyeron uniformemente en el medio de cultivo.

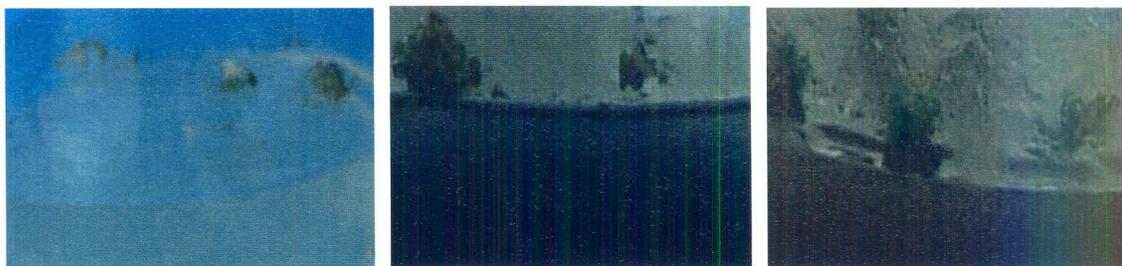
Una vez terminada la siembra, los frascos se cubrieron con papel aluminio después de flamearse para evitar contaminación y se sellaron para finalmente ser colocados en la sala de incubación a una temperatura de  $25\pm 1^\circ \text{ C}$ , a fotoperiodo de 16

horas luz/8 horas oscuridad y una intensidad lumínica de  $41 \mu\text{Mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$  proporcionada por lámparas fluorescentes (luz de día) de 30 W.

**Germinación de semillas.** El porcentaje de germinación se consideró cuando se observó que los embriones rompieron la testa y se cuantificó el número de semillas germinadas por  $\text{cm}^2$ , esto mediante la ayuda de una hoja de papel milimétrico.

**Desarrollo de las plántulas.** Con la finalidad de determinar el medio de cultivo más idóneo para la propagación, se probaron tres medios, en un experimento completamente al azar con 30 repeticiones por tratamiento (frascos).

Una vez germinadas las semillas (fase de protocormo), se seleccionaron los protocormos que midieron de 2 a 3 mm de diámetro y se distribuyeron en un número de cuatro por frasco (unidad experimental) en los medios de cultivo seleccionados para el desarrollo (Figura 2). Todo el proceso se llevó a cabo bajo condiciones de asepsia dentro de la campana de flujo laminar. Los cultivos se incubaron bajo las condiciones antes mencionadas y se realizaron subcultivos mensuales a sus respectivos medios de cultivo.



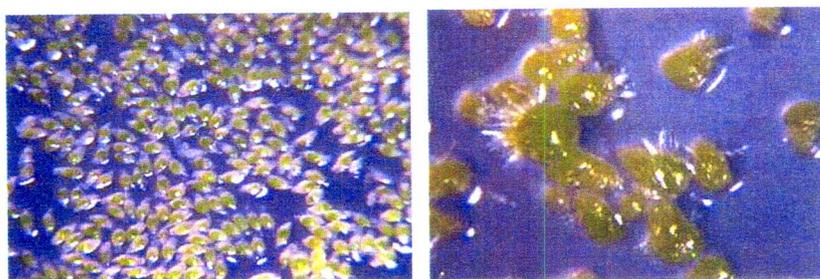
**Figura 2.** Medios de cultivo utilizados para la propagación *in vitro* de *Brassia verrucosa*.

Las variables evaluadas en el desarrollo de las plantas fueron: número de brotes (NB), longitud de hoja (LH), ancho de hoja (AH), número de raíces (NR), longitud de raíces (LR) y altura de plántula (AP), las cuales se registraron cada quince días utilizando un vernier. Se realizó un total de cuatro evaluaciones durante el experimento.

**Análisis de datos.** Los datos obtenidos de las variables (NB, LH, AH, NR, LR y AP), para cada uno de los tratamientos se evaluaron mediante un análisis de varianza. Para los casos que mostraron diferencias significativas se llevó a cabo una prueba de comparación de medias de Tukey a una  $P \leq 0.05$  con el paquete estadístico SAS versión 8.0 (SAS, 1999).

## RESULTADOS

La germinación alcanzada por *Brassia verrucosa* fue de 56.70 % (Figura 3), la cuál dio inicio a los 6 días después de la siembra, considerándose cuando el embrión absorbió agua e incrementó su circunferencia y longitud, llegando a romper la testa.



**Figura 3.** Germinación de semillas de *Brassia verrucosa*

### **Efecto del medio de cultivo en el desarrollo de las plantas.**

El análisis de varianza de los resultados obtenidos (Cuadro 1) mostró diferencias significativas entre los tratamientos ( $P \leq 0.05$ ) para las variables número de brotes (NB), ancho de hoja (AH) y longitud de raíces (LR). La longitud de hoja (LH), número de raíces (NR) y altura de plántula (AP) no se vieron afectadas por los medios de cultivo utilizados para el desarrollo de las plantas.

**CUADRO 1.** Análisis de varianza para número de brotes (NB), longitud y ancho de hoja (LH y AH), número y longitud de raíces (NR, y LR) y altura de plántula (AP) en la propagación *in vitro* de *Brassia verrucosa*.

F.V.	G.L	NB	LH	AH	NR	LR	AP
Tratamiento	2	28.754*	0.124 <sup>NS</sup>	0.013*	18.078 <sup>NS</sup>	1.244*	4.212 <sup>NS</sup>
Error	69	107.925	9.825	0.193	28.431	14.874	36.545
Total	71	136.679	10.949	0.207	46.509	16.118	40.759
C.V.		37.740	21.812	23.177	41.550	52.826	28.016

<sup>NS</sup>, \*; No significativo, significativo con  $P \leq 0.05$ .

En el Cuadro 2 se muestran los resultados de comparación de medias para las variables estudiadas en tres medios de cultivo durante la propagación de *Brassia verrucosa*; sólo las variables AH y LR no mostraron diferencias significativas entre tratamientos, lo que sugiere que dichas variables se ven igualmente afectadas por los medios de cultivo utilizados. Por otro lado en el tratamiento dos se mostraron los mayores valores para las variables número de brotes (NB), longitud de hoja (LH), número de raíces (NR) y altura de planta (AP).

**CUADRO 2.** Comparación de medias para número de brotes, longitud de hoja, ancho de hoja, número y longitud de raíces y altura de plántula para tres medios de cultivo durante la propagación *in vitro* de *Brassia verrucosa*.

Tratamiento	NB	LH	AH	NR	LR	AP
1	2.444b	1.603b	0.208a	0.950c	0.781a	2.334b
2	3.927a	1.900a	0.238a <sup>z</sup>	2.177a	1.064a <sup>z</sup>	2.918a
3	3.569a	1.686ab	0.237a	1.539b	0.790a	2.540ab
<b>DMS</b>	0.864	0.260	0.036	0.450	0.321	0.503

<sup>z</sup>Medias con la misma letra, dentro de columnas, son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey con  $P \leq 0.05$ ; **DMS**: Diferencia mínima significativa, **NB** Número de brotes, **LH** Longitud de hoja en cm., **AH** Ancho de hoja en cm., **NR** número de raíces, **LR** Longitud de raíces en cm., **AP** Altura de plántula en cm., y **T** tratamiento.

## DISCUSIÓN

La germinación de 56.70 % obtenida en *Brassia verrucosa* en el medio Murashige y Skoog (1962) al 100 % es aceptable. Este medio se ha utilizado para la germinación de semillas de diversas especies de orquídeas en diferentes proporciones y suplementado con reguladores de crecimiento y otras sustancias obteniéndose resultados similares. Los resultados obtenidos pueden deberse a los altos contenidos de nitrógeno y potasio de este medio, que ayudaron a la germinación de las semillas, debido a que durante la germinación la mejor fuente de nitrógeno es el nitrato de amonio (Mitra, 1987), también pudo influir la viabilidad presente en las semillas utilizadas. El efecto positivo del medio de cultivo (T2) suplementado con carbón activado y peptona; en la longitud de hoja, número y longitud de raíces y altura de plántula, pudo deberse por un lado a que el carbón activado fomenta una mayor aireación, establece un ambiente oscuro que propicia el desarrollo de las raíces y absorbe sustancias inhibitoras indeseables como el etileno o los pigmentos tóxicos (Arditti, 1993; Pan y Staden, 1998) y por el otro, a que favorece la inducción de yemas, brotes, el desarrollo de raíces y la proliferación de pseudobulbos (Fridborg *et al.*, 1978; Vij *et al.*, 1984; Waes, 2005; Moraes *et al.*, 2005; Nagaraju y Mani, 2005; Yang *et al.*, 2006). Los efectos favorables del carbón activado no solo se presentan en la propagación de orquídeas sino también en otras especies (Nhut, 2008). Lo anterior puede deberse también al efecto de la peptona que puede acelerar la formación de los pseudobulbos (Buyun *et al.*, 2004; Martin y Madassery, 2006).

## CONCLUSIONES

La germinación *in vitro* de las semillas de *Brassia verrucosa* se presentó de forma adecuada para el desarrollo de las plántulas, mismas que fueron establecidas exitosamente en el medio de cultivo MS suplementado con 30 g·litro<sup>-1</sup> de sacarosa, 100 ml·litro<sup>-1</sup> de agua de coco, 40 g·litro<sup>-1</sup> de extractos de manzana, plátano y jitomate, 2.0 g·litro<sup>-1</sup> de peptona, 1.0 g·litro<sup>-1</sup> de carbón activado y 6.5 g·litro<sup>-1</sup> de agar y que se recomienda para su propagación.

Dichas condiciones permitirán la propagación *in vitro* de *Brassia verrucosa* para su rescate y conservación, además de que es una orquídea con alto potencial ornamental.

## LITERATURA CITADA

ARDITTI, J. 1993. Micropropagation of orchids. Ed. John Wiley and Sons. New York. 949 p.

BUYUN, L.; LAVRENTYEVA, A.; KOVALSKA, L.; IVANNIKO R. 2004. *In vitro* germination of seeds of some rare tropical orchids. Acta Universitatis Latvienis Biology 676: 159-162.

FRIDBORG, G.; PEDERSEN, M.; LANDSTROM, L.E.; ERIKSSON, T. 1978. The effect of activated charcoal in tissue culture: absorption of metabolites inhibiting morphogenesis. Physiol. Plant. 43: 104-106.

HAGSATER, E.; M. A. SOTO ARENAS; G. A. SALAZAR CHÁVEZ; R. JIMÉNEZ MACHORRO M.A. LÓPEZ ROSAS; R.L. DRESSLER. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, México, 303 p.

MITRA, G.C. 1987. Some aspects of asymbiotic nutrition of orchis embryos. J. Orch. Soc. Ind. 1:91-108.

MORAES, L.M.; FARIA, R.T.; CUQUEL, F.L. 2005. Activated charcoal for *in vitro* propagation of brazilian orchids. Acta Hort (ISHS) 683:383-389.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A Revised Médium of rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- NAGARAJU, V.; MANI, S.K. 2005. Rapid *in vitro* propagation of Orchid *Zygopetalum intermedium*. *J. Plant. Biochemistry and Biotechnology* 14: 27-32.
- NHUT, D.T.; THI, N. N.; THANK KHIET, B. L.; QUOC LUAN, V. 2008. Peptone stimulates *in vitro* shoot and root regeneration of avocado (*Persea americana* Mill.). *Scientia Horticulturae* 115 (2): 124-128.
- MARTIN, K. P.; MADASSERY, J. 2006. Rapid *in vitro* propagation of *Dendrobium* hybrids through direct shoot formation from foliar explants, and protocorm-like bodies. *Scientia Horticulturae* 108 (1): 95-99.
- PAN, M.J.; STADEN, VAN. 1998. The use of charcoal *in vitro* culture – a review. *J. Plant. Growth Regulation* 26 (3): 155-163.
- VIJ, S.P.; SOOD, A.; PLAHA, K.K. 1984. Propagation of *Rhynchostylis retusa* BL. (Orchidaceae) by direct organogenesis from leaf segment cultures. *Botanical Gazette* 145(2): 210-214.

YANG, N.; HU, H.; HUANG, J.; XU, K.; WANG, H.; ZHO, Z. 2006.

Micropropagation of *Cypripedium flavum* through multiple shoots of seedlings derived from mature seeds. J. Plant Cell 84 (1): 1573-5044.

WAES, V. J. 2005. Effect of activated charcoal on *in vitro* propagation of western European orchids. Acta Hort. (ISHS) 212.

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UNA POBLACIÓN DE VAINILLA**  
**(*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) DE PAPANTLA, VERACRUZ<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Georgina Flores Escobar; Juan Porfirio Legaria Solano; Isaías Gil Vázquez. Enviado a la Revista Chapingo. Serie Horticultura

## RESUMEN

La vainilla (*Vanilla planifolia*) pertenece a la familia de las orquídeas, crece entre los 150 a 600 metros sobre el nivel del mar en climas cálido y semicálido, asociada a la selva tropical perennifolia y bosque de encino. Las principales plantaciones comerciales de vainilla en México se localizan en la región de Papantla en Veracruz. En el cultivo de la vainilla no se detecta una diferenciación fenotípica notable entre las plantas cultivadas y las silvestres. Se realizó la caracterización molecular de una población de vainilla de la región de Papantla Veracruz, utilizando marcadores moleculares tipo RAPD. La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando 0.3 g de tejido fresco proveniente de brotes nuevos. Se probaron 12 iniciadores y las reacciones de PCR (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés) se realizaron con el programa siguiente: un ciclo a 94 °C (2 min); 38 ciclos (30 seg a 94 °C, 30 seg a 40 °C y 90 seg a 72 °C) y un ciclo final a 72 °C (90 seg.). El ADN genómico obtenido presentó calidad aceptable, ocho iniciadores mostraron productos de amplificación y un patrón de bandeo aceptable. Se encontró un polimorfismo promedio de 67.5 % que denota variabilidad genética intermedia en la población de vainilla. El dendrograma obtenido con RAPD definió cuatro grupos relacionados dentro de la población.

Palabras clave: *Vanilla planifolia*, marcadores RAPD, variabilidad genética.

## ABSTRACT

The vanilla (*Vanilla planifolia*) from the Orchids family, grows between 150 to 600 meters above sea level in the warm and semi warm climates, it is associated to rainforest and oak forest. The main commercial plantations of vanilla in Mexico are localized in the Papantla Veracruz region. In the vanilla it is not detected any notable phenotypic differentiation between cultivated and wild plants. A molecular characterization was made in a vanilla population from Papantla Veracruz, with RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markers. The DNA extraction was made using 0.3 g of fresh tissue from news shoots. Twelve primers were tested. The PCR (Polymerase Chain Reaction) were made with the following program: a cycle of 94 °C (2 min); 38 cycles (30 seg at 94 °C, 30 seg at 40 °C and 90 seg at 72 °C) and a final cycle of 72 °C (90 seg). The genomic DNA obtained was acceptable in quality, eight primers showed amplification products and an acceptable band pattern. The average polymorphism was 67.5 % that denotes intermediate genetic variability in the vanilla population. Dendrogram obtained with RAPD defined four groups in the population.

Key words: *Vanilla planifolia*, RAPD markers, Genetic variability.

## INTRODUCCIÓN

La vainilla es un bejuco perenne de vida larga que pertenece a la familia de las orquídeas, tiene su centro de diversidad y área de origen en México. La mayoría de las accesiones cultivadas en el mundo fueron derivadas de un sola accesión, posiblemente del cultivar Mexicano Mansa (Severine *et al.*, 2008). La vainilla es una planta trepadora de tallo cilíndrico carnosos, con hábito de crecimiento hemiepífita, presenta raíces adventicias, hojas alternas alargadas, carnosas y brillantes. Además, posee flores de color blanco amarillento y su fruto es una cápsula parecida a una vaina, con semillas numerosas y casi microscópicas. La vainilla presenta metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) y crece entre los 150 a 600 metros sobre el nivel del mar, habita en climas cálido y semicálido y se asocia a la selva tropical perennifolia y bosque de encino (Cibrian, 1999). En 1760 se reportó el primer cultivo usando esquejes de vainilla en los alrededores de Papantla, Veracruz y es en esa región donde actualmente se localizan las principales plantaciones comerciales de vainilla en México (Soto-Arenas, 2003). El cultivo de la vainilla tiene ciertas peculiaridades; no se detecta una diferenciación fenotípica notable entre las plantas cultivadas y las silvestres, por lo que no puede considerarse como una planta domesticada. Es probable que la base genética original haya sido muy estrecha y que la propagación vegetativa que se practica en las plantaciones haya causado uniformidad en ellas.

Algunos estudios morfométricos y genéticos sugieren la existencia de sólo 30 individuos silvestres, la mayoría en México, en los estados de Veracruz, Oaxaca,

Chiapas y Quintana Roo, y un par en Costa Rica (Cibrián, 1999; Schlütter, 2002; Soto-Arenas, 2006). A diferencia de muchos cultivos, la vainilla es cultivada principalmente por su fruto, del que se obtiene la vainillina ( $C_8H_8I_3$ ) sustancia responsable del olor y sabor característico, mismo que varía según la especie y el lugar donde se cultive. Ésta se encuentra disuelta en un aceite color café oscuro, alrededor de las semillas en el centro de la vaina, de ahí el color casi negro de ésta. La vainillina es utilizada ampliamente en confitería, pastelería, perfumería, chocolatería, fabricación de licores, droguería, farmacología, confección de cigarrros, galletas, bebidas gaseosas y artesanía. Sin embargo, la vainilla natural, cultivada en plantaciones y curada con métodos tradicionales, ha tenido un competidor desde hace tiempo: la vainillina sintética. Ésta se sintetiza a partir de la lignina de algunas coníferas, del eugenol y de otras sustancias y es mucho más barata que la vainilla natural. Investigaciones recientes han determinado los precursores y casi todas las enzimas involucradas en la ruta metabólica de la síntesis de la vainillina en los frutos de vainilla lo cual permitirá producir en los próximos años vainillina sintética del mismo modo como lo producen las plantas de vainilla. Estos avances biotecnológicos pueden poner en riesgo el futuro de la producción de vainilla en las plantaciones que son agroecosistemas forestales, donde los árboles de sombra y tutores ayudan a mantener los ciclos biogeoquímicos mucho mejor que los cultivos anuales, preservando el paisaje, parte de la biodiversidad local y la capacidad de regeneración de la selva donde se llevan a cabo; así mismo, estas plantaciones son bastante rentables en áreas pequeñas donde integra a la familia y comunidad en el cultivo (Soto-Arenas, 2006).

Las aplicaciones de los marcadores moleculares para el estudio de la vainilla son diversas, entre ellas: en la diferenciación de individuos, discriminación entre clones, análisis filogenéticos y taxonómicos, mapeo de genomas, cuantificación de variabilidad génica intra e inter específica, mejora genética, localización de genes de resistencia a enfermedades, y estudios de dispersión de especies. Marcadores moleculares tipo RAPD y AFLP han servido para la caracterización de híbridos de vainilla y su progenie (Divakaran *et al.*, 2006; 2007).

Por lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la variabilidad genética presente en una población de vainilla de la región de Papantla, Veracruz, utilizando marcadores moleculares tipo RAPD.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal.** Consistió de secciones de brotes nuevos de 22 plantas seleccionadas al azar (Figura 1) en una plantación de 21 hectáreas y tres años de edad localizada en el Ejido Primero de Mayo, municipio de Papantla, Veracruz. Los esquejes de aproximadamente 1.50 metros de longitud fueron adaptados en invernadero; una vez obtenidos los brotes nuevos se utilizaron secciones de ellos para la extracción y purificación de ADN.



**Figura 1.** Planta y flor de vainilla (*Vanilla planifolia*) en estado natural, en Papantla, Veracruz, México.

**Extracción y purificación de ADN genómico.** La extracción de ADN se realizó de acuerdo con el protocolo de Dellaporta *et al.* (1983). De las secciones de los brotes nuevos se tomó 0.3 g de tejido fresco, el cual fue desinfectado con etanol a 70 % y agua estéril para su maceración en nitrógeno líquido. El tejido pulverizado fue transferido a un microtubo de 1.5 ml, conteniendo 600 µl de amortiguador de extracción

(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA), mezclando muy bien y agitando por breves segundos. Posteriormente se incubó a 65 °C durante 10 minutos, con inversión ocasional de los tubos. Transcurrido el tiempo de incubación se adicionaron 200 µl de acetato de potasio 5 M, agitando por inversión y dejando en hielo durante 30 minutos; posteriormente se centrifugó a 15 000 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente y se transfirió el sobrenadante a otro microtubo conteniendo 700 µl de isopropanol frío. Después de mezclar por inversión se colocó a -20 °C durante 30 minutos para luego centrifugar durante 5 minutos a 10 000 xg a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se disolvió en 200 µl de solución para diluir. Se añadió 2 µl de ARNasa A e incubó a 37° C durante 1 hora. Se adicionó 20 µl de acetato de sodio 3 M y 200 µl de isopropanol, mezclando por inversión e incubó a -20 °C durante 2 horas. Posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 10 000 xg a temperatura ambiente, el sobrenadante fue eliminado para luego lavar el precipitado con 300 µl de etanol al 70 % (v/v). Finalmente el precipitado se secó y disolvió en 100 µl de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) y las muestras se almacenaron a 4 °C.

#### **Evaluación de la calidad y cantidad de ADN**

En un tubo eppendorf se agregaron 5 µl de ADN original y 995 µl de agua bidestilada estéril, mezclando perfectamente para colocarlo en un espectrofotómetro Jenway 6305 UV/vis, previamente calibrado a 260 nm y con los valores de absorbancia obtenidos se calculó la concentración de ADN en la solución de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$\text{Concentración de ADN } (\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}) = (\text{Abs}_{260}) (200) (50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}) / 1000$$

Donde:

$\text{Abs}_{260}$  = Absorbancia en nanómetros.

200 = Factor de dilución.

$50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} = 1 \text{ D}\cdot\text{O}$

D·O = Densidad óptica.

Una vez cuantificado el ADN, se verificó su integridad y calidad mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 % (p/v); a) se calculó la cantidad de ADN original necesario para cargar 1  $\mu\text{g}$  en el gel; b) realizados los cálculos, se pesó 0.24 g de agarosa y se midieron 30 ml de TAE 1X, la agarosa se colocó en un matraz al cual se adicionó el TAE, poniendo a hervir la mezcla para disolver perfectamente y obtener una concentración al 0.8 % (p/v) de agarosa.

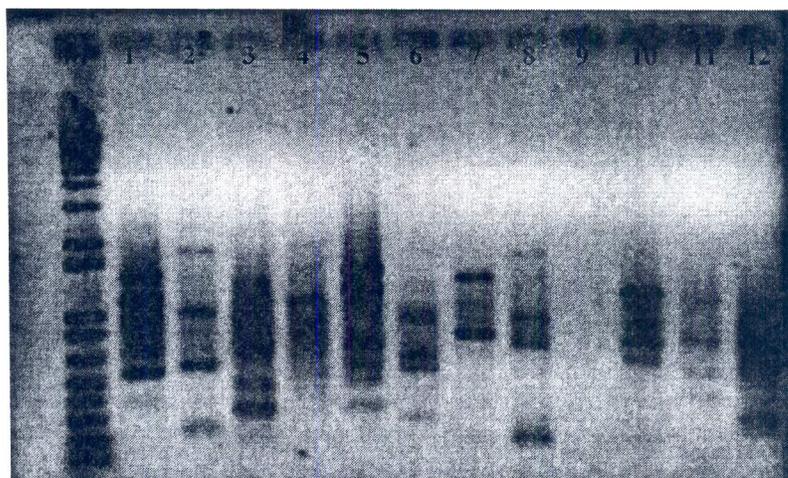
Una vez fría la mezcla, se vació en un portageles con un peine para formar pozos; solidificado el gel y removido el peine, se colocó dentro de la cámara de electroforesis cubriéndolo con amortiguador de corrida TAE 0.5 X. Enseguida, en un trozo de parafilm se colocaron gotas de amortiguador de carga (Cuadro 1), mismas que se mezclaron con la cantidad de ADN calculada. Posteriormente, el ADN de las muestras más el amortiguador se depositó en los pozos centrales y en los dos extremos del gel se colocaron 3  $\mu\text{l}$  de marcador de peso molecular de 1 kb plus. La electroforesis se realizó a 90 voltios durante 10 minutos, permitiendo la entrada de las muestras al gel, ajustando el voltaje a 60 voltios hasta finalizar la electroforesis. Concluida la electroforesis, el gel fue removido y teñido en una solución a base de bromuro de etidio (Cuadro 1) durante 15 minutos. Por último, el gel se escurrió y colocó sobre un transiluminador de luz UV documentandose con una cámara Kodak EDAS 290.

**Cuadro 1.** Soluciones utilizadas para cargar y teñir geles de agarosa.

<b>Soluciones</b>	<b>Reactivos</b>
Amortiguador TAE 1X	Tris-base 40 mM (pH 7.8), acetato de sodio 20 mM, EDTA 2mM (pH 8.0)
Amortiguador de carga	0.2 % azul de bromofenol (p/v) 0.2 % xileno cianol (p/v) 25 % glicerol (v/v) 5 mM EDTA
Bromuro de etidio	50 mM Tris-HCL (pH 8.0) 0.5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ en TAE 1X

### **Obtención de los patrones RAPD**

Para la obtención de los patrones RAPD se probaron 12 iniciadores, de los cuáles se seleccionaron los 8 que mostraron un mejor patrón de bandeo (Figura 2). Posteriormente se realizaron las reacciones de PCR (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés) con los iniciadores seleccionados.



**Figura 2.** Patrones de bandeo resultantes de la prueba de 12 iniciadores. Carriles: 1: IBT-1, 2: IBT-2, 3: IBT-3, 4: IBT-4, 5: IBT-5, 6: IBT-6, 7: IBT-8, 9: A-01, 10: A-02, 11: A-03, 12: A-04. M: marcador de peso molecular 1kb plus (Invitrogen®).

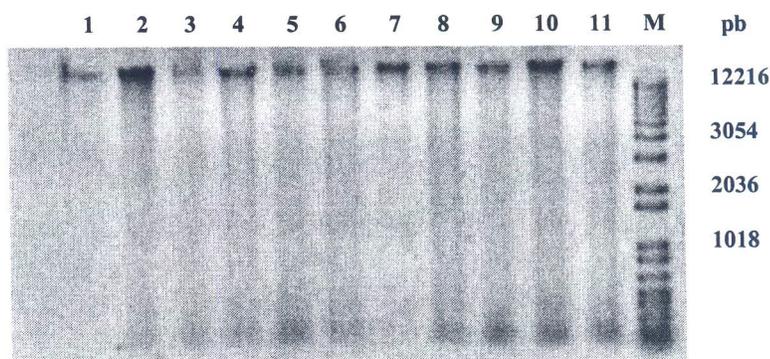
**Reacciones de amplificación.** Las reacciones de PCR (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés) se realizaron en un termociclador TECHNE® TC-412, utilizando el programa siguiente: un ciclo a 94 °C (2 min); 38 ciclos (30 seg a 94 °C, 30 seg a 40 °C y 90 seg a 72 °C) y un ciclo final a 72 °C (90 seg), para lo cual se realizó una mezcla en un tubo eppendorf en un volumen total de 25 µl de los reactivos siguientes; 3.2 µl de agua bidestilada estéril, 10 µl de dNTPs (10 mM), 2.5 µl amortiguador 10X, 1.0 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 3.0 µl iniciador (10 pmol/µl), 5.0 µl de ADN (10 ng/µl) y 0.3 µl de Taq ADN-polimerasa (INVITROGEN®) (5U/µl).

La electroforesis de los productos de reacción se realizó en geles de agarosa de UltraPure™ Agarose-1000® (INVITROGEN, EE.UU) al 1.2 % (p/v). El marcador de peso molecular utilizado fue 100 bp DNA Ladder® (INVITROGEN). Los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (0.5 mg·ml<sup>-1</sup>) y se visualizaron utilizando el Sistema de Análisis e Interpretación de Geles EDAS 290® (KODAK).

Los materiales se compararon con base en similitudes y diferencias en los patrones de bandeo RAPD, se asignó el valor de 1 a la presencia de una banda y de 0 a la ausencia de la misma, de esa forma se construyó una matriz básica de datos (MBD). Con la MBD se calculó una matriz de similitud utilizando el coeficiente de Jaccard (Jaccard, 1908), la cuál se utilizó para construir un dendrograma utilizando el programa NTSYS-Pc versión 2.1 (Rohlf, 1992). Posteriormente con la MBD se realizaron 1000 remuestreos (bootstrapping) para llegar a obtener un dendrograma de mayor robustéz. Finalmente, con la MBD se realizó un análisis de componentes principales utilizando NTSYS-Pc versión 2.1 (Rohlf, 1992) para obtener la formación de grupos de genotipos definidos agrupándolos con base en los dos primeros componentes principales.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La calidad del ADN genómico obtenido fue adecuada para llevar a cabo la caracterización molecular (Figura 3). Por otro lado, de los doce iniciadores probados, sólo ocho mostraron productos de amplificación y un patrón de bandeo adecuado para ser utilizados en la caracterización molecular.



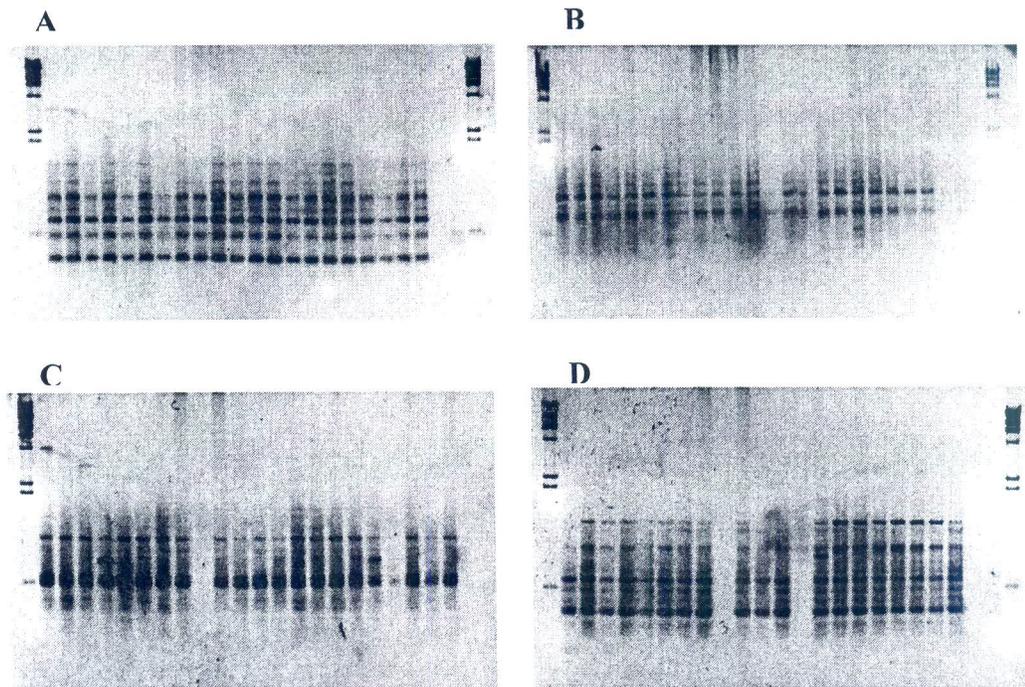
**Figura 3.** Calidad del ADN genómico purificado de secciones de brotes de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews 1808) de Papantla, Veracruz, México. 1-11 Muestras de ADN; M, Marcador de peso molecular 1 kb plus.

El polimorfismo promedio encontrado al llevar a cabo la caracterización molecular fue de 67.5 % (Cuadro 2, Figura 4), lo que denota una diversidad genética intermedia. Sin embargo Soto-Arenas (1999) al trabajar con material de vainilla procedente del norte del estado de Veracruz y llevar a cabo la caracterización con aloenzimas, encuentra una pequeña variación genética, determinando que el material presente es homocigoto; por otro lado Schluter *et al.* (2007) al evaluar la diversidad y la estructura genética dentro de *Vanilla planifolia* encontraron una alta diversidad genética en un grupo del sur del eje neovolcánico transversal conformado por los estados de

Oaxaca, Chiapas y Quintana Roo. El polimorfismo encontrado en el presente estudio pudo deberse a que los esquejes utilizados en la plantación provienen posiblemente de diversas fuentes tanto del estado de Veracruz como de Oaxaca, principalmente.

**Cuadro 2.** Lista de iniciadores analizados, sus secuencias, número de productos amplificados, y polimorfismo total.

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Productos Totales	Amplificados polimórficos	% de bandas polimórficas	% de bandas monomórficas
IBT-1	CCG GCC TTC C	10	8	80.0	2
IBT-2	CCG GCT GGA A	10	8	80.0	2
IBT-3	GTA GAC GAG C	10	8	70.0	3
IBT-4	GTG CGT CCT C	10	7	90.0	1
IBT-5	CCC GCC TTC C	10	9	70.0	3
IBT-6	TTC CCC GCC C	10	7	30.0	7
IBT-7	CAA ACG GCA C	10	3	70.0	7
IBT-8	ATG TGT TGC G	10	7	50.0	3
<b>Promedio</b>		<b>10</b>	<b>6.75</b>	<b>67.5</b>	<b>3.5</b>



**Figura 4.** Diferentes grados de polimorfismo en patrones de productos de amplificación en Vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews 1808) de Papantla, Veracruz, México. A: Iniciador IBT- 1, B: Iniciador IBT- 2, C: Iniciador IBT- 3, D: Iniciador IBT- 4.

En el dendrograma de la Figura 5 se presenta la definición de cuatro grupos después de un análisis de los patrones de bandeo utilizando el programa NTSYS.Pc versión 2.1. El grupo I se formó con los genotipos Vp1, Vp2, Vp4, Vp15, Vp16, Vp6, Vp11, Vp17, Vp8, Vp10, Vp12, Vp20 y Vp21; el grupo II se integró con los genotipos Vp3, Vp5, Vp7, Vp18, Vp14, Vp9 y Vp19, respectivamente; el genotipo Vp13 quedó incluido en el grupo III, mientras que el genotipo Vp22 formó el grupo IV.

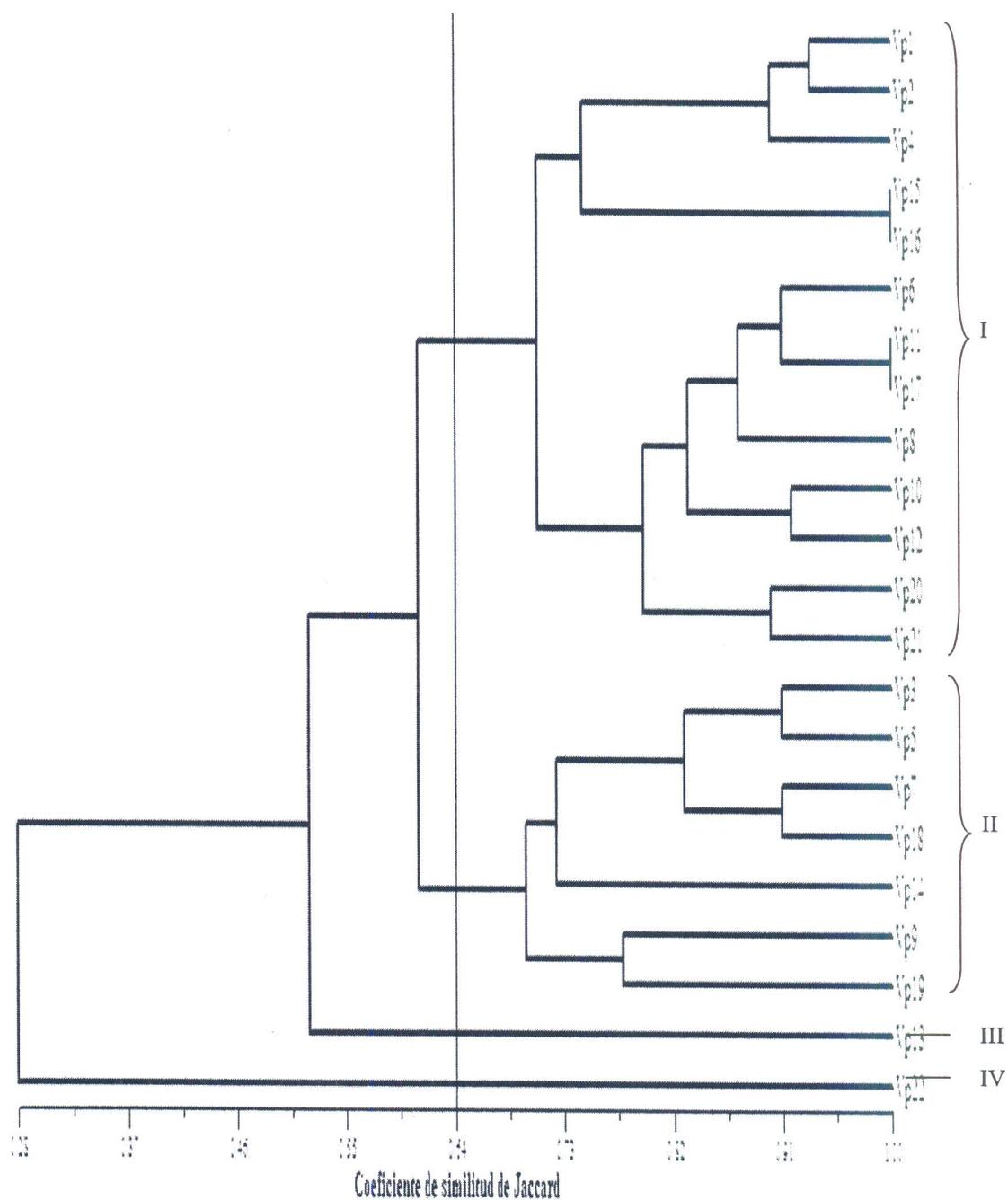
Los genotipos genéticamente más alejados fueron Vp22 y Vp14 con un valor de similitud del 14 %, los genéticamente más relacionados fueron Vp15 y Vp16 con un valor de similitud de 81 %, y Vp17 y Vp11 con un valor de similitud del 83 %.

En la Figura 6 se muestra el agrupamiento obtenido mediante un análisis de 1000 remuestreos utilizando el programa NTSYS.Pc versión 2.1, mismo que define un mayor número de grupos cuando se compara con el dendrograma de la Figura 5

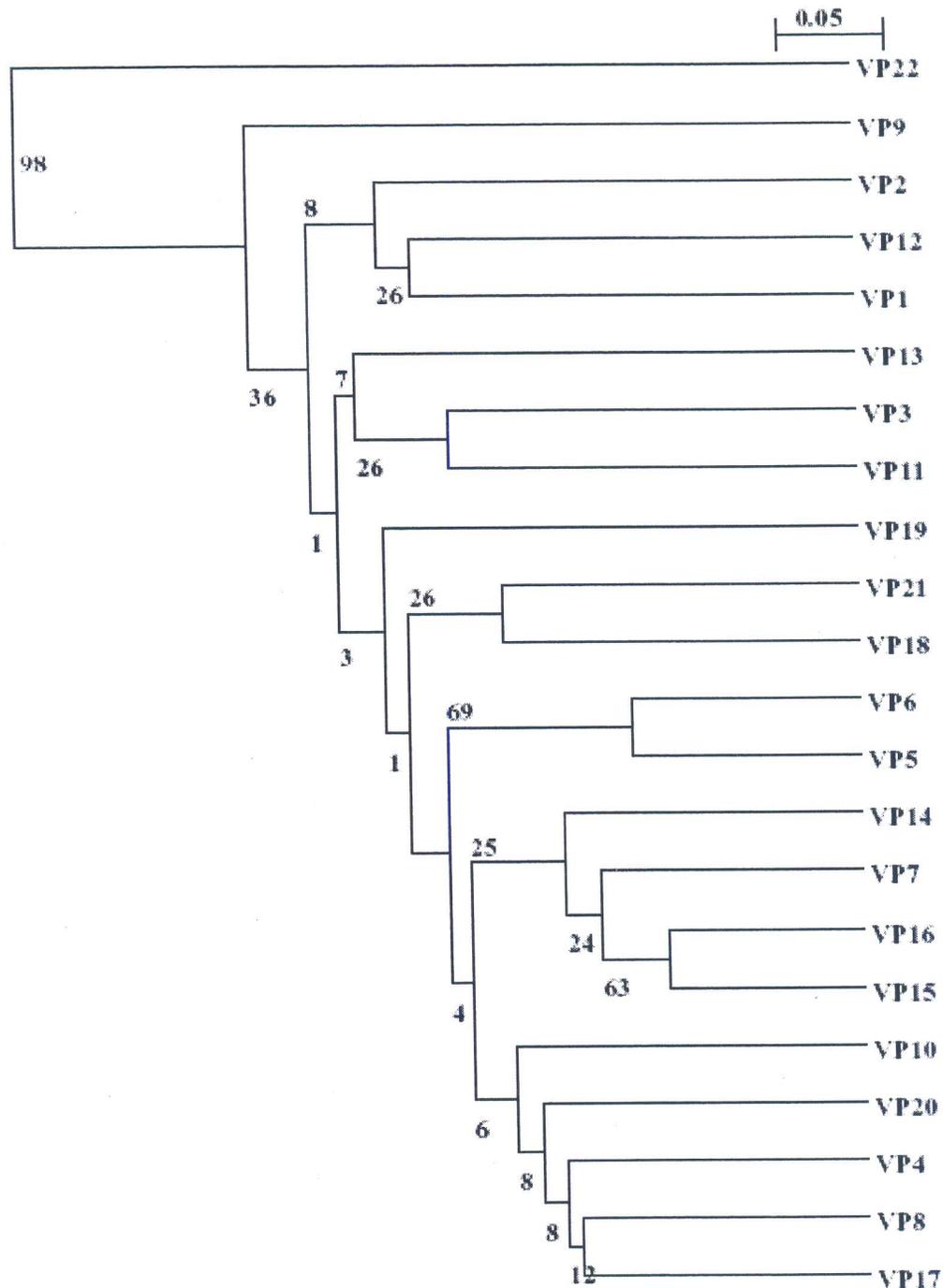
Por otro lado, el análisis de componentes principales mostró que el primer componente principal explica el 56.35 % de la variabilidad encontrada, mientras que el segundo y tercero explican el 5.59 % y 4.55 %, respectivamente (Cuadro 3). Veintidós componentes principales explicaron el 100 % de la variabilidad.

**Cuadro 3.** Valores Eigen y varianza acumulada obtenida del análisis de Componentes Principales de patrones de bandas RAPD's de vainilla (*Vanilla planifolia*) de Papantla, Veracruz, México.

CP	Eigen-valor	Porcentaje (%)	
		Individual	Acumulada
1	12.39	<b>56.35</b>	<b>56.35</b>
2	1.23	5.59	61.94
3	1.00	4.55	66.49
4	0.90	4.11	70.61
5	0.83	3.79	74.41
6	0.70	2.87	77.61
7	0.63	2.87	80.49
8	0.61	2.79	83.28
9	0.51	2.34	85.63
10	0.47	2.14	87.77
11	0.41	1.87	89.64
12	0.37	1.69	91.33
13	0.31	1.42	92.76
14	0.29	1.35	94.12
15	0.23	1.05	95.18
16	0.21	0.95	96.14
17	0.19	0.89	97.03
18	0.16	0.75	97.79
19	0.15	0.70	98.49
20	0.12	0.56	99.06
21	0.10	0.48	99.55
22	0.09	0.44	100.00

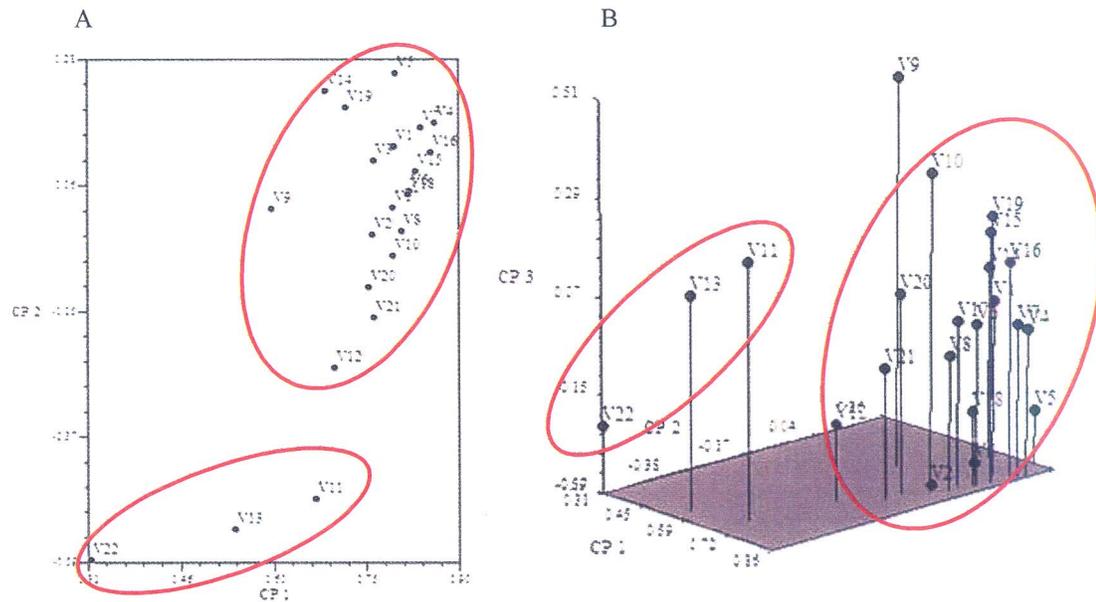


**Figura 5.** Dendrograma construido mediante el coeficiente de similitud de Jaccard con los patrones de bandas RAPD's obtenido de 22 genotipos de secciones de brotes de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews, 1808) provenientes de Papantla, Veracruz, México.



**Figura 6.** Dendrograma construido a partir de 1000 combinaciones de remuestreo obtenido de los productos RAPD's de 22 genotipos de secciones de brotes de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews, 1808). Los números en las ramas indican el porcentaje en que la topología de una rama particular se repite

En la Figura 7 se presentan gráficas en dos y tres dimensiones donde se muestra la distribución de los genotipos evaluados. Se observa que la mayoría de los materiales están genéticamente relacionados, mientras que Vp11, Vp13 y Vp22 se agruparon de forma separada.



**Figura 7.** Componentes principales obtenidos de 22 genotipos de secciones de brotes de vainilla (*Vanilla planifolia*) provenientes de Papantla, Veracruz, México. A. Gráfica en dos dimensiones. B. Gráfica tridimensional.

En el Cuadro 4 se indica la contribución de las bandas obtenidas con los iniciadores utilizados a los cuatro primeros componentes principales. A la variabilidad explicada por el CP1 contribuyeron 18 bandas de 7 iniciadores; al CP2 contribuyen ocho bandas de 6 iniciadores; al CP3 contribuyen 11 bandas de cuatro iniciadores y al CP4 contribuyen 5 bandas de cuatro iniciadores.

**Cuadro 4.** Vectores propios de cuatro componentes principales (CP) procedentes de patrones de bandas RAPD de 22 genotipos de *Vanilla planifolia*.

Banda	CP1	CP2	CP3	CP4
INI 1-1	0.228	<b>0.907</b>	<b>0.649</b>	<b>0.914</b>
INI 1-2	<b>0.719</b>	-0.030	-0.696	-0.270
INI 1-3	0.562	0.205	-0.468	-0.244
INI 1-4	0.111	-0.217	0.014	-0.326
INI 1-5	0.471	-0.794	0.572	-0.650
INI 1-6	0.150	-0.849	-0.086	-0.477
INI 1-7	0.471	-0.794	0.572	-0.650
INI 1-8	0.283	-0.046	0.274	-0.970
INI 1-10	0.146	-0.320	0.494	<b>0.640</b>
INI 2-2	0.243	-0.785	0.596	0.175
INI 2-3	0.086	0.313	<b>0.838</b>	0.250
INI 2-4	<b>0.693</b>	-0.861	<b>0.934</b>	-0.084
INI 2-5	0.202	-0.872	<b>0.611</b>	0.381
INI 2-6	0.088	0.572	-0.565	-0.725
INI 2-7	0.202	-0.872	<b>0.611</b>	0.381
INI 2-9	<b>0.718</b>	0.545	<b>0.609</b>	0.488
INI 2-10	<b>0.817</b>	<b>0.853</b>	<b>0.835</b>	0.341
INI 3-4	<b>0.973</b>	0.231	-0.351	-0.325
INI 3-5	<b>0.908</b>	-0.404	0.195	0.464
INI 3-6	<b>0.695</b>	0.515	0.071	0.370
INI 3-7	<b>0.970</b>	<b>0.690</b>	-0.779	0.061
INI 3-8	0.583	-0.941	0.223	<b>0.807</b>
INI 3-9	<b>0.837</b>	-0.409	0.118	0.290
INI 3-10	0.507	0.242	0.041	0.264
INI 4-2	0.393	-0.872	<b>0.778</b>	0.579
INI 4-3	0.483	-0.972	<b>0.975</b>	-0.620
INI 4-4	0.105	-0.010	0.005	0.014
INI 4-5	0.295	<b>0.651</b>	-0.806	-0.797
INI 4-6	0.018	0.375	0.104	0.142
INI 4-7	0.271	-0.423	0.228	0.151
INI 4-8	<b>0.680</b>	-0.174	<b>0.624</b>	0.437
INI 4-9	<b>0.615</b>	<b>0.909</b>	-0.279	-0.283
INI 4-10	0.271	-0.423	0.228	0.151
INI 5-2	<b>0.933</b>	-0.362	-0.272	-0.326
INI 5-3	<b>0.648</b>	<b>0.634</b>	-0.468	-0.872
INI 5-4	0.078	0.517	-0.965	-0.580
INI 5-6	0.086	-0.607	-0.848	<b>0.713</b>
INI 5-7	<b>0.894</b>	0.031	-0.240	0.017
INI 5-8	0.437	<b>0.641</b>	-0.347	-0.477
INI 5-10	0.403	-0.064	-0.215	-0.460
INI 6-5	0.081	0.362	-0.112	-0.516
INI 6-6	0.108	0.579	-0.336	-0.996
INI 6-7	0.048	0.342	0.486	0.042
INI 7-3	0.318	-0.810	<b>0.679</b>	-0.113
INI 7-4	<b>0.764</b>	0.373	0.267	0.105
INI 7-5	<b>0.639</b>	0.439	-0.274	-0.000
INI 7-6	0.472	0.051	-0.045	<b>0.683</b>
INI 7-7	<b>0.983</b>	0.390	-0.119	-0.861
INI 7-10	0.426	0.394	-0.128	-0.881
INI 8-2	0.080	-0.121	-0.602	-0.222
INI 8-7	0.224	-0.460	0.343	0.066
INI 8-8	0.100	<b>0.758</b>	-0.117	-0.329
INI 8-9	0.243	-0.785	-0.596	0.175
INI 8-10	<b>0.676</b>	-0.049	-0.952	-0.861

## **CONCLUSIONES**

El uso de brotes nuevos para la extracción y purificación del ADN fue el adecuado para obtener aceptable integridad del mismo. De los trece iniciadores utilizados, ocho de ellos presentaron patrones de productos de amplificación y el iniciador tres identificó mejores patrones de productos de amplificación. Los marcadores tipo RAPD sirvieron para detectar el polimorfismo genético en vainillas provenientes de Papantla, Veracruz, México. El polimorfismo total encontrado fue de 67.5 % lo que indica la existencia de variabilidad genética en el material vegetal. El primer componente principal explica mas del 50 % de la varianza total.

## LITERATURA CITADA

- CIBRIÁN, J.A. 1999. Variación genética de *Vainilla planifolia* en México. Tesis Profesional, Facultad de Ciencias, UNAM, México. 125 p.
- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, L. J.; HICKS, J. B. 1983. A plant DNA minipreparation. Version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1:19-21.
- DIVAKARAN, M.; NIRMAL, B. K.; PETER, K. V.; RAVINDRAN, P. N. 2006. Inter specific hybridization in vanilla and molecular characterization of hybrids and selfed progenies using RAPD and AFLP markers. Scientia Horticulturae 108:414-422.
- DIVAKARAN, M.; JAYAKUMAR, V. N.; VEENA, S.S.; VIMALA, J.; BASHA, A.; SAJI, K.V.; NIRMAL, B. K. AND PETER, K. V. 2007. Genetic variations and relationships in cultivated *Vanilla planifolia* and few related species using RAPD polymorphism. Genetic Resources and Crop Evolution. 952-953 pp.
- JACCARD, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat. 44: 223-270.

ROHLF, F. J. 1992. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system (version 2.1). State University of New York. 32 p.

SOTO-ARENAS, M. A. 1999. Conservation of the genetic resources of vanilla. The Journal of the Canadian Orchid Congress 11 (1):3.

----- 2003. *Vanilla* (tratamiento genérico), en A.M. Pridgeon, P.J. Cribb, M.W. Chase y F.N. Rasmussen (eds.), *Genera Orchidacearum*, Vol. 3. Orchidoideae (part two) Vanilloideae. pp. 321-334. Oxford University Press.

-----2006. La vainilla: retos y perspectivas de su cultivo. Boletín Bimestral de la Comisión para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Biodiversitas 66: 2-9.

SEVERINE, B.; LUBINSKY, P.; RISTERUCCI, A.M.; NOYER, J.L.; GRISONI, M.; DUVAL, M.F.; BESSE, P. 2008. Patterns of introduction and diversification of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) in Reunion Island. (Indian Ocean). American Journal of Botany 95: 805-815.

SCHLÜTER, P.M. 2002. RAPD variation in *Vanilla planifolia*, Jackson (Orchidaceae) and assessment of the putative hybrid *Vanilla tahitensis* Moore. Tesis, School of Biochemistry, University of Oxford. 125 p.

SCHLÜTER, P.M.; SOTO- ARENAS, M.; HARRIS, S. A. 2007. Genetic variation in  
*Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Economic Botany* 61(4) 328:336.

**VARIACIÓN MOLECULAR DE DIVERSAS ESPECIES DE  
ORQUÍDEAS MEXICANAS<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Georgina Flores Escobar y Juan Porfirio Legaria Solano.  
Para enviar a la Revista Fitotecnia Mexicana

## RESUMEN

El número de géneros y especies de orquídeas existentes en México se estima entre 1106 y 1400. Sin embargo, los estudios moleculares para conocer la variabilidad genética entre ellas es aún reducido, por lo que en el presente estudio se identificó molecularmente 26 especies de orquídeas mexicanas y se evaluó la variación intra e interespecífica de *Encyclia hanburyi*, *Encyclia citrina*, *Encyclia polybulbon*; *Laelia autumnalis*, *Laelia speciosa*; *Leochilus carinatus*; *Lemboglossum aptera*; *Oncidium stramineum*, *Oncidium sphacelatum* y *Oncidium cavendishianum*. El material vegetal utilizado consistió en secciones de brotes nuevos de 113 plantas de diversas especies de orquídeas, la extracción de ADN se realizó con el protocolo de Dellaporta *et al.* (1983). Se utilizaron 8 iniciadores para la obtención de los patrones RAPD, el programa utilizando para realizar las reacciones de PCR (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés) consistió en: un ciclo a 94 °C (2 min); 38 ciclos (30 seg a 94 °C, 30 seg a 40 °C y 90 seg a 72 °C) y un ciclo final a 72 °C (90 seg). La mayor diversidad genética se presentó en *Encyclia citrina* con un valor de 58.17 % y la menor en *Lemboglossum aptera* con un valor de 35.6 %. *Laelia speciosa* presentó un valor de polimorfismo intermedio, de 56.7 %. Los resultados obtenidos son de gran utilidad debido a que no se cuenta con estudios moleculares suficientes que ayuden a explicar la gran diversidad de orquídeas mexicanas.

Palabras clave: Estudios moleculares, marcadores RAPD, variabilidad genética.

## ABSTRACT

The number of genera and species of orchids present in México is considered between 1106 and 1400, however molecular studies to know the genetic variability among them are still reduced. This is the reason why in the present study 26 species of Mexican orchids and the interspecific variation of *Encyclia hanburyi*, *Encyclia citrina*, *Encyclia polybulbon*; *Laelia autumnalis*, *Laelia speciosa*; *Leochilus carinatus*; *Lemboglosum aptera*; *Oncidium stramineum*, *Oncidium sphacelatum* y *Oncidium cavendishianum* were identified molecularly. The vegetal material used was sections of new buds of 113 plants of diverse species of orchids, DNA extraction was made according to the protocol of Dellaporta (1983). Eight primers were used to obtain RAPD patterns, the PCR reactions (Polymerase Chain Reaction) were made with the following program: a cycle of 94 °C (2 min); 38 cycles (30 seg at 94 °C, 30 seg at 40 °C and 90 seg at 72 °C) and a final cycle of 72 °C (90 seg). The greatest genetic diversity was presented in *Encyclia citrina* with a value of 58.17 % and the lowest in *Lemboglosum aptera* 35.6 %. *Laelia speciosa* presented an intermediate polymorphism value of 56.7 %. The results obtained are very useful to help explain the great diversity of Mexican orchids.

Key words: Molecular studies, RAPD markers, Genetic variability.

## INTRODUCCIÓN

Las orquídeas mexicanas se caracterizan por contar con una gran cantidad de géneros y especies, estimándose entre 1106 y 1400, aunque aún no se ha concluido su inventario, por lo que el número puede ser mayor. Aproximadamente el 60 % de las orquídeas mexicanas se localiza en los bosques de niebla. Los estados de la República Mexicana que cuentan con mayor diversidad de orquídeas son Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Guerrero, Morelos, Jalisco, Michoacán, Quintana roo, Puebla, Nayarit, Tlaxcala y San Luís Potosí (Téllez, 2005; Hágsater *et al.*, 2005).

Datos resultantes de la aplicación de técnicas moleculares están siendo utilizados cada vez más en estudios filogenéticos en orquídeas (Dixon *et al.*, 2003), y en la identificación precisa de individuos en forma independiente del ambiente lo que permite determinar relaciones genéticas entre ellos. Entre los marcadores moleculares, el más común es el RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) utilizado para determinar la diversidad genética en cultivos (Williams *et al.*, 1990). En orquídeas se han empleado tanto Aloenzimas como los marcadores moleculares RAPD y RFLP (Obara-Okeyo y Kako, 1998; Wong y Sun, 1999) para identificar cultivares de orquídeas, determinar niveles de variabilidad genética, construcción de árboles filogenéticos, conocer el tamaño del genoma y determinar la estructura de poblaciones (Narayan *et al.*, 1989), principalmente en híbridos comerciales, entre ellos para los géneros *Cymbidium*, *Cattleya*, *Dendrobium*, *Phalaenopsis*, *Paphiopedilum*, *Vanda* y *Oncidium* (Alcantara, 2006; Aung y Tan, 1996; Goh *et al.*, 2005; Obara, 1998; Saw *et*

*al.*, 1999) así mismo se han utilizado en especies de orquídeas amenazadas, tales como *Cypripedium*, *Spiranthes* y *Goodyera*, entre otras. Los marcadores moleculares también han sido utilizados para evaluar variación genética y estructura de poblaciones en especies de orquídeas en peligro de extinción (Szalanski *et al.*, 2001).

En México se han utilizado Isoenzimas y marcadores moleculares RAPD para conocer la variabilidad genética en *Laelia albida*, *Laelia speciosa* y *Vanilla planifolia* (Avila-Díaz y Oyama, 2007; Schlüter *et al.*, 2007). Sin embargo, aún son muchas las especies que no han sido estudiadas. Por lo que el presente trabajo tuvo como objetivos identificar molecularmente a 26 especies de orquídeas mexicanas y determinar la variación inter e intraespecífica de los géneros *Enciclya*, *Laelia*, *Lemboglossum* (*Rhynchostele*), *Leochilus* y *Oncidium*, mediante marcadores moleculares tipo RAPD.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Material vegetal.**

El material vegetal consistió de secciones de brotes nuevos de 113 plantas de diversas especies de orquídeas (Figura 1) de la colección de orquídeas mexicanas del Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

**Extracción y purificación de ADN genómico.** La extracción de ADN se realizó de acuerdo con el protocolo de Dellaporta *et al.* (1983). De las secciones de brotes nuevos se tomó 0.3 g de tejido fresco, el cual fue desinfectado con etanol a 70 % y agua estéril para su maceración en nitrógeno líquido. El tejido pulverizado fue transferido a un microtubo de 1.5 ml, que contenía 600 µl de amortiguador de extracción (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA). La mezcla se agitó por pocos segundos. Posteriormente se incubó a 65 °C durante 10 minutos, con inversión ocasional de los tubos. Transcurrido el tiempo de incubación se adicionaron 200 µl de acetato de potasio 5 M, agitando por inversión y dejando en hielo durante 30 minutos; posteriormente se centrifugó a 15 000 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente y se transfirió el sobrenadante a otro microtubo conteniendo 700 µl de isopropanol frío. Después de mezclar por inversión se colocó a -20 °C durante 30 minutos para luego centrifugar durante 5 minutos a 10 000 xg a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se disolvió en 200 µl de solución para diluir. Se añadió 2 µl de ARNasa A e incubó a 37 °C durante 1 hora. Se adicionó 20 µl de acetato de sodio 3 M y 200 µl de

isopropanol, mezclando por inversión e incubó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas. Posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a  $10\ 000\ \text{xg}$  a temperatura ambiente, el sobrenadante fue eliminado para luego lavar el precipitado con  $300\ \mu\text{l}$  de etanol al  $70\ \%$  (v/v). Finalmente el precipitado se secó y disolvió en  $100\ \mu\text{l}$  de TE ( $10\ \text{mM}$  Tris-HCl,  $\text{pH}\ 8.0$ ,  $1\ \text{mM}$  EDTA) y las muestras se almacenaron a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **Evaluación de la calidad y cantidad de ADN**

En un tubo eppendorf se agregaron  $5\ \mu\text{l}$  de ADN original y  $995\ \mu\text{l}$  de agua bidestilada estéril, mezclando perfectamente para colocarlo en un espectrofotómetro Jenway 6305 UV/vis, previamente calibrado a  $260\ \text{nm}$  y con los valores de absorbancia obtenidos se calculó la concentración de ADN en la solución de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$\text{Concentración de ADN } (\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}) = (\text{Abs}_{260}) (200) (50\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}) / 1000$$

Donde:

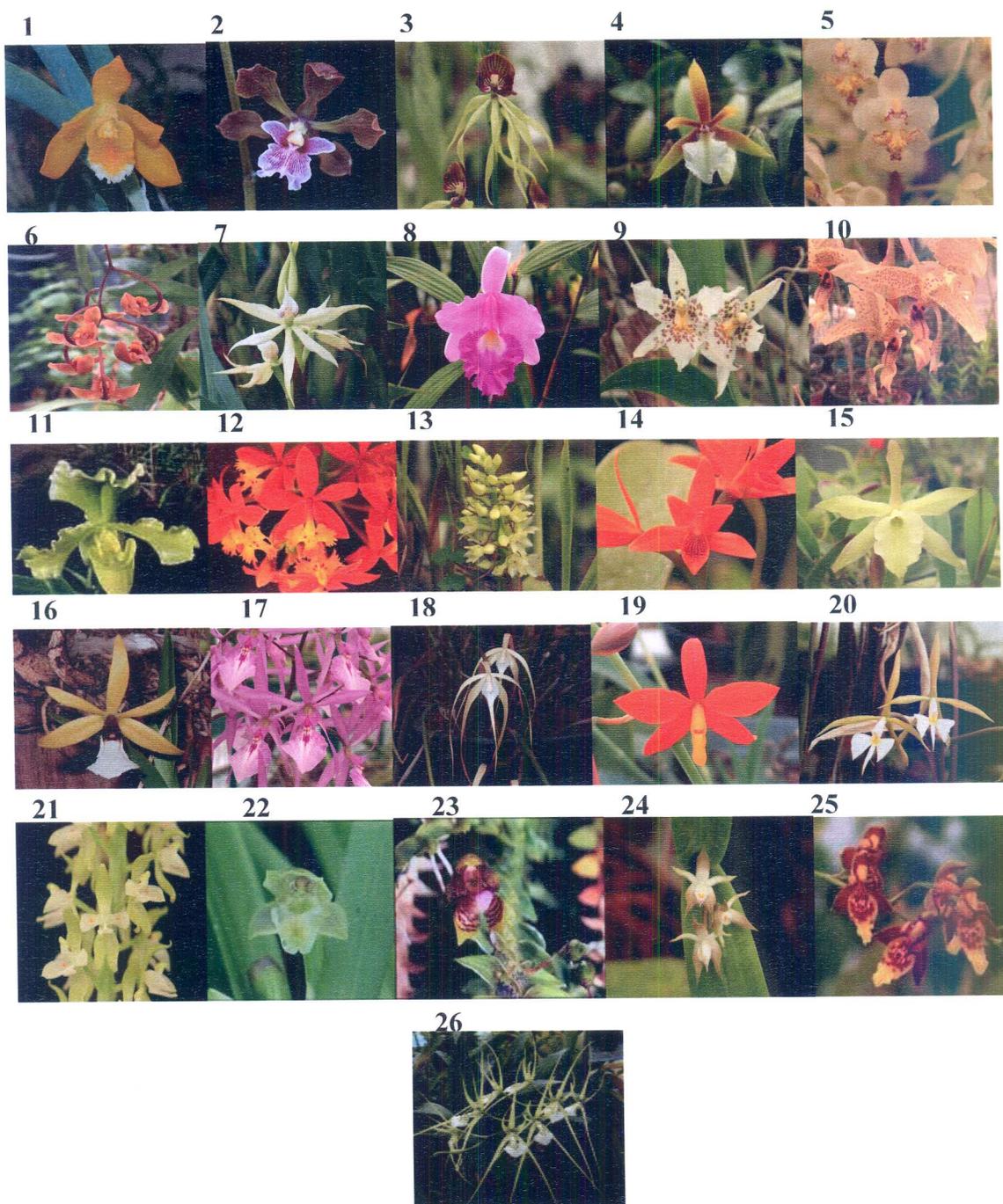
$\text{Abs}_{260}$  = Absorbancia en nanómetros.

200 = Factor de dilución.

$50\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} = 1\ \text{D}\cdot\text{O}$

$\text{D}\cdot\text{O}$  = Densidad óptica.

Una vez cuantificado el ADN, se verificó su integridad y calidad mediante electroforesis en un gel de agarosa al  $0.8\ \%$  (p/v); a) se calculó la cantidad de ADN original necesario para cargar  $1\ \mu\text{g}$  en el gel; b) realizados los cálculos, se pesó  $0.24\ \text{g}$  de agarosa y se midieron  $30\ \text{ml}$  de TAE 1X, la agarosa se colocó en un matraz al cual se adicionó el TAE, poniendo a hervir la mezcla para disolver perfectamente y obtener una concentración al  $0.8\ \%$  (p/v) de agarosa.



**Figura 1.** Plantas de orquídeas mexicanas estudiadas 1: *Encyclia citrina* (*Prosthechea citrina*), 2: *Encyclia hanburyi*, 3: *Anacheilium cloleatum*, 4: *Encyclia polybulbon*, 5: *Oncidium stramineum*, 6: *Gongora galeata*, 7: *Anacheilium chondylobulbon*, 8: *Sobralia macranta*, 9: *Lemboglossum aptera*, 10: *Stanhopea oculata*, 11: *Paphiopedium insigne*, 12: *Epidendrum radicans*, 13: *Coelia triptera*, 14: *Cattleya aurantiaca*, 15: *Rhyncholaelia glauca*, 16: *Prosthechea tripunctata*, 17: *Encyclia adenocaula*, 18: *Brassavola cuculata*, 19: *Prosthechea vitellina*, 20: *Epidendrum parkinsonianum*, 21: *Notylia barkeri*, 22: *Scaphyglottis livida*, 23: *Dichaea neglecta*, 24: *Leochilus carinatus*, 25: *Hormidium pygmaeum*, 26: *Brassia verrucosa*.

Una vez fría la mezcla, se vació en un portageles con un peine para formar pozos; solidificado el gel y removido el peine, se colocó dentro de la cámara de electroforesis cubriéndolo con amortiguador de corrida TAE 0.5 X. Enseguida, en un trozo de parafilm se colocaron gotas de amortiguador de carga (Cuadro 1), mismas que se mezclaron con la cantidad de ADN calculada de acuerdo con la fórmula mencionada previamente. Posteriormente, el ADN de las muestras más el amortiguador se depositó en los pozos centrales y en los dos extremos del gel se colocaron 3 µl de marcador de peso molecular de 1 kb plus. Finalmente se realizó la electroforesis a 90 voltios durante 10 minutos, permitiendo la entrada de las muestras al gel, para luego ajustar el voltaje a 60 voltios hasta finalizar la electroforesis.

Concluida la electroforesis, el gel fue removido y teñido en una solución a base de bromuro de etidio (Cuadro 1) durante 15 minutos. Finalmente se escurrió y colocó sobre un transiluminador de luz UV y se documentó con una cámara Kodak EDAS 290.

**Cuadro 1.** Soluciones utilizadas para cargar y teñir geles de agarosa.

<b>Soluciones</b>	<b>Reactivos</b>
Amortiguador TAE 1X	Tris-base 40 mM (pH 7.8), acetato de sodio 20 mM, EDTA 2mM (pH 8.0)
Amortiguador de carga	0.2 % azul de bromofenol (p/v) 0.2 % xileno cianol (p/v) 25 % glicerol (v/v) 5 mM EDTA 50 mM Tris-HCL (pH 8.0)
Bromuro de etidio	0.5 µg µl <sup>-1</sup> en TAE 1X

### **Obtención de los patrones RAPD**

Para la obtención de los patrones RAPD se utilizaron 8 iniciadores, los cuáles mostraron un adecuado patrón de bandeo (Cuadro 2). Posteriormente se realizaron las

reacciones de PCR (Polimerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés) con los ocho iniciadores.

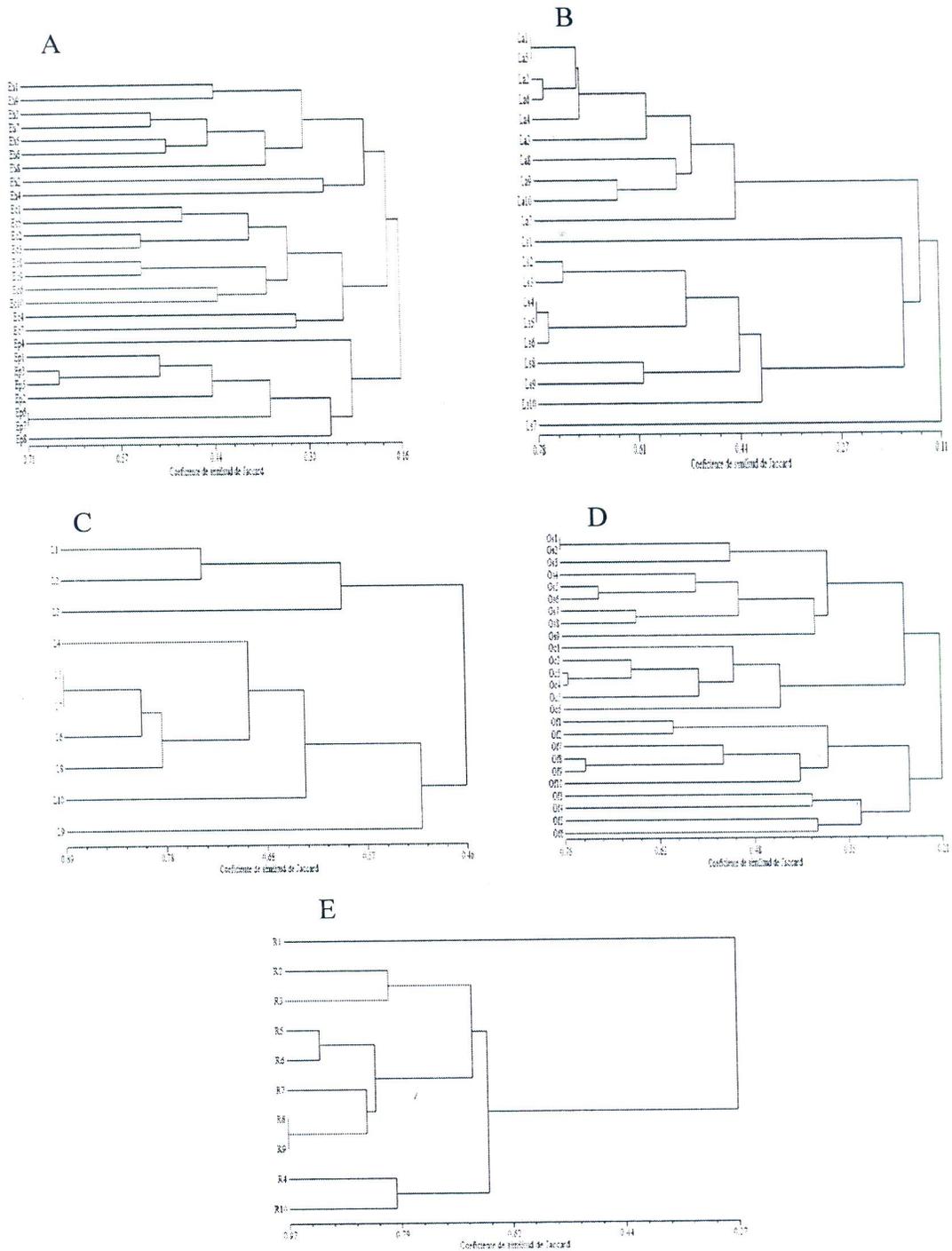
**Reacciones de amplificación.** Las reacciones de PCR (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés) se realizaron en un termociclador marcas TECHNE® TC-412, utilizando el programa siguiente: un ciclo a 94 °C (2 min); 38 ciclos (30 seg a 94 °C, 30 seg a 40 °C y 90 seg a 72 °C) y un ciclo final a 72 °C (90 seg), para lo cual se realizó una mezcla en un tubo eppendorf en un volumen total de 25 µl de los reactivos siguientes; 3.2 µl de agua bidestilada estéril, 10 µl de dNTPs (10 mM), 2.5 µl amortiguador 10X, 1.0 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 3.0 µl iniciador (10 pmol/µl), 5.0 µl de ADN (10 ng/µl) y 0.3 µl de Taq ADN-polimerasa (INVITROGEN®) (5U/µl). La electroforesis de los productos de reacción se realizó en geles de agarosa de UltraPure™ Agarose-1000® (INVITROGEN, EE.UU) al 1.2 % (p/v). El marcador de peso molecular utilizado fue 100 bp DNA Ladder® (INVITROGEN). Los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (0.5 mg·ml<sup>-1</sup>) y se visualizaron utilizando el Sistema de Análisis e Interpretación de Geles EDAS 290® (KODAK).

Los materiales se compararon con base en similitudes y diferencias en los patrones de bandeo RAPD, se asignó el valor de 1 a la presencia de una banda y de 0 a la ausencia de la misma, y de esa forma se construyó una matriz básica de datos (MBD). Con la MBD se calculó una matriz de similitud utilizando el coeficiente de Jaccard (Jaccard, 1908), misma que se utilizó para construir un dendrograma utilizando el programa NTSYS-Pc versión 2.1 (Rohlf, 1992).

alejada es *E. polybulbon*. *E. hanburyi* y *E. citrina* a un coeficiente de similitud de 0.19, mientras que *E. hanburyi* se une a 0.16.

El dendrograma de la figura 4B muestra dos grupos definidos entre los individuos de *Laelia autumnalis* y *Laelia speciosa*, lo que coincide con las características morfológicas de ambas especies. El dendrograma de la figura 4C muestra como se agrupan todos los individuos de *Leochilus carinatus*. Por otro lado en el dendrograma de la figura 4D se observan tres grupos; el primero formado por los individuos de *Oncidium cavendishianum*, el segundo integrado por los individuos de *Oncidium sphacelatum* y el tercero por los individuos de *Oncidium stramineum*, las tres especies se encuentran relacionadas entre si, cabe hacer notar que aunque las características morfológicas de *Oncidium sphacelatum* no coinciden con las de las especies *O. cavendishianum* y *O. stramineum*, el dendrograma muestra una relación entre las tres especies. *O. stramineum* relacionó más fuertemente con *O. cavendishianum* y la especie más alejada fue *O. sphacelatum*. Las primeras dos relacionan a un coeficiente de similitud de 0.27 y la especie *O. sphacelatum* se une con ambas especies a un coeficiente de similitud de 0.21.

Debido a que los coeficientes de similitud con que agrupan las diferentes especies dentro de los géneros y los individuos dentro de las especies, son relativamente bajos, se infiere la existencia de variabilidad genética entre especies de un mismo género y en individuos que conforman a las especies. El dendrograma de la figura 4E muestra el agrupamiento de los individuos de *Lemboglossum aptera*, actualmente *Rhynchostele aptera*.



**Figura 4.** Dendrogramas construidos mediante el coeficiente de Jaccard con los patrones de bandas RAPD obtenido de orquídeas mexicanas de los géneros A: *Encyclia* (*Eh*, *Ec* y *Ep*), B: *Laelia* (*La*, *Ls*), C: *Leochilus* (*Lc*), D: *Oncidium* (*Os*, *Oc*, *Of*) y E: *Lemboglossum* (*Rhynchostele*) (*R*).

Los valores de polimorfismo promedio encontrados en los géneros estudiados se muestran en el cuadro 2, observándose el valor más alto (85.4 %) para *Laelia*, *Encyclia* tuvo un valor de 73.9 %, en *Oncidium* fue de 60.5 %, el polimorfismo en *Leochilus* fue de 43.1 %, siendo el género *Lemboglossum* el que presentó la menor variación genética, con un valor de polimorfismo de 35.6 %.

Por otro lado, en el cuadro 3 se indican los valores de polimorfismo para las diferentes especies del género *Encyclia*, donde *E. citrina* presenta el mayor polimorfismo (58.17 %), *E. hanburyi* mostró un valor intermedio (46.7 %) y *E. polybulbon* tuvo el menor (37.27 %). Lo anterior es de suma importancia para el diseño de estrategias de conservación de las especies de este género, ya que *E. polybulbon* muestra una menor diversidad genética de entre las tres especies evaluadas y pudiera estar amenazada o en peligro de extinción. En el cuadro 4 se observa el polimorfismo encontrado entre las especies evaluadas del género *Oncidium*, donde *O. stramineum* presenta el mayor valor (53.8 %), *O. sphacelatum* tuvo un polimorfismo intermedio (46.1 %) y *O. cavendishianum* mostró el menor valor (39.3 %), mismo que da una idea de la baja diversidad genética de esta especie. El cuadro 5 indica el polimorfismo promedio encontrado entre las especies del género *Laelia*, donde, *L. speciosa* tuvo el mayor valor (56.7 %) y *Laelia autumnalis* 48.8 %, lo que sugiere que de las dos especies estudiadas, *Laelia autumnalis* tiene una menor diversidad genética. Avila-Díaz y Oyama (2007) encontraron una diversidad genética de 76 % en poblaciones naturales de *Laelia speciosa*, lo cual comparado con lo obtenido en el presente estudio para la misma especie pareciera ser un valor bajo, sin embargo los individuos aquí estudiados provienen de material conservado en forma *ex situ* lo que sugiere que la manipulación

del material vegetal trae como consecuencia la disminución de la variación genética y por tanto la conservación *in situ* es de suma importancia para mantener ésta. En el cuadro 6 se observa el polimorfismo encontrado en la especie *Lemboglossum aptera* siendo de 35.6 %. Finalmente en el cuadro 7 se observa el polimorfismo promedio 43.1 % obtenido en *Leochilus carinatus*.

Los valores de polimorfismo aquí detectados para cada una de las especies de orquídeas son mucho mayores a los reportados por Sun y Wong (2001) en poblaciones naturales de *Zeuxine* y *Eulophia* donde el mayor valor obtenido fue de 20.97 %.

**Cuadro 2.** Lista de iniciadores analizados, sus secuencias, número de productos amplificados y polimorfismo total en los géneros: *Encyclia*, *Laelia*, *Lemboglossum* (*Rhynchostele*), *Leochilus* y *Oncidium*

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Total Bandas amplificadas	Polimorfismo por género									
			<i>Encyclia</i>		<i>Laelia</i>		<i>Lemboglossum</i>		<i>Leochilus</i>		<i>Oncidium</i>	
			No. Bandas Polimórficas	%								
IBT-1	CCG GCC TTC C	13	8	61.5	11	84.6	6	46.0	6	46.0	10	76.9
IBT-2	CCG GCT GGA A	13	11	84.6	12	92.0	5	38.4	4	30.7	10	76.9
IBT-3	GTA GAC GAG C	13	9	69.2	11	92.0	1	7.6	4	30.7	8	61.5
IBT-4	GTG CGT CCT C	13	9	69.2	13	100.0	7	53.8	8	61.5	6	46.0
IBT-5	CCC GCC TTC C	13	10	76.9	11	84.6	3	32.0	6	46.0	10	76.9
IBT-6	TTC CCC GCC C	13	12	92.0	8	61.5	4	30.7	4	30.7	9	69.2
IBT-7	CAA ACG GCA C	13	10	76.9	12	92.0	5	38.4	6	46.0	10	76.9
IBT-8	ATG TGT TGC G	13	8	61.5	10	76.9	5	38.4	7	53.8	10	76.9
<b>Promedio</b>		<b>13</b>	<b>9.6</b>	<b>73.9</b>	<b>11</b>	<b>85.4</b>	<b>4.5</b>	<b>35.6</b>	<b>5.6</b>	<b>43.1</b>	<b>9.1</b>	<b>60.5</b>

**Cuadro 3.** Lista de iniciadores analizados, sus secuencias, número de productos amplificados y polimorfismo total en las especies estudiadas del género *Encyelia*: *Encyelia hanburyi* ( *Eh*), *Encyelia citrina* ( *Ec*) y *Encyelia polybulbon* ( *Ep*).

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Total Bandas amplificadas	Polimorfismo en <i>Encyelia hanburyi</i> , <i>Encyelia citrina</i> y <i>Encyelia Polybulbon</i>		
			<i> Eh</i>	<i> Ec</i>	<i> Ep</i>
			No. Bandas Polimórficas	No. Bandas Polimórficas	No. Bandas Polimórficas
IBT-1	CCG GCC TTC C	12	4	5	3
IBT-2	CCG GCT GGA A	12	8	5	7
IBT-3	GTA GAC GAG C	12	6	7	4
IBT-4	GTG CGT CCT C	12	6	7	1
IBT-5	CCC GCC TTC C	12	6	10	8
IBT-6	TTC CCC GCC C	12	6	8	8
IBT-7	CAA ACG GCA C	12	5	9	2
IBT-8	ATG TGT TGC G	12	4	5	3
<b>Promedio</b>		<b>12</b>	<b>5.6</b>	<b>7</b>	<b>4.5</b>
			<b>46.7</b>	<b>58.17</b>	<b>37.27</b>

**Cuadro 4.** Lista de iniciadores analizados, sus secuencias, número de productos amplificados y polimorfismo total en las especies estudiadas del género *Oncidium*: *O. stramineum* (*Os*), *O. sphacelatum* (*Of*) y *O. cavendishianum* (*Oc*).

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Total Bandas amplificadas	Polimorfismo en <i>Oncidium stramineum</i> , <i>Oncidium sphacelatum</i> y <i>Oncidium cavendishianum</i> .					
			<i>Os</i>	<i>Of</i>	<i>Oc</i>			
			No. Bandas Polimórficas	%	No. Bandas Polimórficas	%	No. Bandas Polimórficas	%
IBT-1	CCG GCC TTC C	13	9	69.9	8	61.5	5	38.4
IBT-2	CCG GCT GGA A	13	5	38.4	3	23.0	2	15.3
IBT-3	GTA GAC GAG C	13	6	46.1	5	38.4	1	07.6
IBT-4	GTG CGT CCT C	13	5	38.4	5	38.4	4	30.7
IBT-5	CCC GCC TTC C	13	10	76.9	6	46.1	7	53.8
IBT-6	TTC CCC GCC C	13	9	69.2	5	38.4	5	69.2
IBT-7	CAA ACG GCA C	13	5	38.4	6	46.1	7	53.8
IBT-8	ATG TGT TGC G	13	7	53.8	10	76.9	6	46.1
<b>Promedio</b>		<b>13</b>	<b>7</b>	<b>53.8</b>	<b>6</b>	<b>46.1</b>	<b>4.6</b>	<b>39.3</b>

**Cuadro 5.** Lista de iniciadores analizados, sus secuencias, número de productos amplificados y polimorfismo total en las especies estudiadas del género *Laelia*: *Laelia autumnalis* (*La*) y *Laelia speciosa* (*Ls*).

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Total Bandas Amplif.	Polimorfismo en <i>Laelia autumnalis</i> ( <i>La</i> ) y <i>Laelia speciosa</i> ( <i>Ls</i> )			
			<i>La</i>		<i>Ls</i>	
			No. Bandas Polimórf.	%	No. Bandas Polimórf.	%
IBT-1	CCG GCC TTC C	13	9	68.2	4	30.7
IBT-2	CCG GCT GGA A	13	7	53.8	10	76.9
IBT-3	GTA GAC GAG C	13	6	46.1	11	84.6
IBT-4	GTG CGT CCT C	13	8	61.5	11	84.6
IBT-5	CCC GCC TTC C	13	5	38.4	8	61.5
IBT-6	TTC CCC GCC C	13	9	69.2	1	0.7
IBT-7	CAA ACG GCA C	13	3	23.0	10	76.9
IBT-8	ATG TGT TGC G	13	4	30.7	5	38.4
<b>Promedio</b>		<b>13</b>	<b>6.3</b>	<b>48.8</b>	<b>7.5</b>	<b>56.7</b>

**Cuadro 6.** Lista de iniciadores analizados, sus secuencias, número de productos amplificados y polimorfismo total en *Lemboglossum aptera* (*Rhynchostele aptera*).

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Total de Bandas amplificadas	Polimorfismo en <i>Lemboglossum aptera</i> ( <i>Rhynchostele aptera</i> )	
			No. Bandas Polimórficas	%
IBT-1	CCG GCC TTC C	13	6	46.0
IBT-2	CCG GCT GGA A	13	5	38.4
IBT-3	GTA GAC GAG C	13	1	7.6
IBT-4	GTG CGT CCT C	13	7	53.8
IBT-5	CCC GCC TTC C	13	3	32.0
IBT-6	TTC CCC GCC C	13	4	30.7
IBT-7	CAA ACG GCA C	13	5	38.4
IBT-8	ATG TGT TGC G	13	5	38.4
<b>Promedio</b>		<b>13</b>	<b>4.5</b>	<b>35.6</b>

**Cuadro 7.** Lista de iniciadores analizados, sus secuencias, número de productos amplificados y polimorfismo total en *Leochilus carinatus*.

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Total de Bandas amplificadas	Polimorfismo en <i>Leochilus carinatus</i>	
			No. Bandas Polimórficas	%
IBT-1	CCG GCC TTC C	13	6	46.0
IBT-2	CCG GCT GGA A	13	4	30.7
IBT-3	GTA GAC GAG C	13	4	30.7
IBT-4	GTG CGT CCT C	13	8	61.5
IBT-5	CCC GCC TTC C	13	6	46.0
IBT-6	TTC CCC GCC C	13	4	30.7
IBT-7	CAA ACG GCA C	13	6	46.0
IBT-8	ATG TGT TGC G	13	7	53.8
<b>Promedio</b>		<b>13</b>	<b>5.6</b>	<b>43.1</b>

## CONCLUSIONES

Los marcadores moleculares permitieron identificar por sus patrones RAPD a cada especie estudiada, cada una de las especies presentó un patrón de bandeo diferente, obteniéndose con ello la huella genética de 26 especies de orquídeas. Mediante los marcadores moleculares tipo RAPD se detectó la variabilidad genética existente en los cinco géneros de orquídeas estudiados. El género *Laelia* presentó el mayor valor (85.4 %) y el género *Lemboglossum* el menor (35.6 %). Se determinó el porcentaje de polimorfismo inter e intraespecífico de: *Encyclia hanburyi*, *Encyclia citrina*, *Encyclia polybulbon*, *Laelia autumnalis*, *Laelia speciosa*, *Lemboglossum aptera* (*Rhynchostele aptera*), *Leochilus carinatus*, *Oncidium stramineum*, *Oncidium sphacelatum* y *Oncidium cavendishianum*. Los marcadores moleculares RAPDs sirven de herramienta para priorizar las especies de orquídeas a ser conservadas en base a su variabilidad genética.

Los resultados aquí obtenidos son de utilidad ya que en la literatura no se reportan estudios moleculares suficientes que den una idea de la diversidad de orquídeas mexicanas.

## LITERATURA CITADA

- OBARA-OKEYO, P. Y KAKO, S. 1998. Genetic diversity and identification of *Cymbidium* cultivars as measured by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Biomedical and Life Sciences* 99(2): 95-101.
- ALCANTARA, S.; SEMIR, J.; SOLFERINI, V.N. 2006. Low genetic structure in an Epiphytic Orchidaceae (*Oncidium hookeri*) in the Atlantic Rainforest of South-eastern Brazil. *Annals of Botany* 98 (6): 1207-1213.
- AUNG, A. M.; TAN, S. T. 1996. RAPD analysis of DNA polymorphism among three flipper orchid species, *Paphiopedilum barbatum*, *P. callosum*, and *P. niveum*. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*. *Biol. Biotechnol* (4)3: 196-202.
- AVILA-DIAZ, I. AND KEN OYAMA. 2007. Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *Am. J. Botany* 94(2): 184-193.
- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, L. J.; HICKS, J. B. 1983. A plant DNA miniprep. Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19-21.

- GOH, M. W.K.; KUMAR, P.P.; LIM, S.H.; TAAN, H. T. W. 2005. Random amplified polymorphic DNA analysis of the moth orchids, *Phalaenopsis* (Epidendroideae: Orchidaceae). *Euphytica* 141(1-2) : 11-22.
- JACCARD, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat.* 44: 223-270.
- NARAYAN R. K. J.; PARIDA A.; VIJ S. P. 1989. Variation in DNA Orchidaceae. *Nucleus* 32: 71-75.
- ROHLF, F. J. 1992. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system (version 2.1). State University of New York. 32 p.
- SAW-HOON L.; CHYE-PENG, T.; YEW-HWA, L.; CHONG-JIN, G. 1999. RAPD Analysis of some species in the genus *Vanda* (Orchidaceae) *Annals of Botany* 83: 193-196.
- SCHLÜTER, P.M.; SOTO- ARENAS, M.; HARRIS, S. A. 2007. Genetic variation in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Economic Botany* 61(4) 328:336.
- SZALANSKI, A. L.; STEINAUER, G.; BISCHOF, R.; PETERSEN J. 2001. Origin and conservation genetics of the threatened *Ute ladies-tresses*, *Spiranthes diluvialis* (Orchidaceae). *Am. J. Botany* 88(1): 177-180.

- SUN, M. AND WONG K.C. 2001. Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding system using RAPD and allozyme markers. *American Journal of Botany* 88(12): 2180.
- TÉLLEZ V., M. A. A. 2005. La orquídea, flor cumbre de la evolución. *Revista Conversus* No. 38, marzo de 2005. Instituto Politécnico Nacional. México. 10-21 pp.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J.A.; TINGLEY, S. V. 1990. DNA Polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids.* 18:6531-6535.
- WONG, K. C. AND SUN, M. 1999. Reproductive biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 86: 1406-1413.

## DISCUSIÓN GENERAL

La germinación de *Oncidium stramineum* (47.69 %) fue relativamente baja de acuerdo con Arditti (1992), quien menciona que los porcentajes de germinación de orquídeas epifitas tropicales sobre un medio asimbiótico suele ser mayor a 50 %. La baja germinación pudo deberse a factores diversos, entre ellos a que no todas las semillas de una cápsula se forman completamente o son fértiles y sólo germinan las que tienen un embrión viable (Arditti y Ghani, 2000). También, en muchos casos el embrión es muy pequeño con relación a la testa por lo que el volumen de la semilla puede estar ocupado por un 96 % de aire (Arditti, 1992) y la humedad no llega al embrión. Sin embargo, en comparación con lo que ocurre en la naturaleza, donde germina sólo el 5 % de las semillas producidas y de éstas sólo un porcentaje muy pequeño alcanza la etapa adulta (Pierik, 1990), el porcentaje de germinación obtenido es satisfactorio. Por el contrario, *Brassia verrucosa* presentó una germinación del 56.70 % en el medio Murashige y Skoog (1962) al 100 %, lo cual es aceptable. Lo anterior pudo deberse a los altos contenidos de nitrógeno y potasio del medio, que ayudaron a la germinación de las semillas, debido a que durante la germinación la mejor fuente de nitrógeno es el nitrato de amonio (Mitra, 1987), también pudo influir la viabilidad presente en las semillas utilizadas. El medio de cultivo adicionado con extractos orgánicos y polivinil pirrolidona (PVP) presentó mayor efectividad para el desarrollo de *Oncidium stramineum*, debido probablemente a que la adición de ésta al medio de cultivo reduce el necrosamiento del tejido y evita la oxidación (Abenavoli y Pennisi, 1998; Pérez *et al.*

2001). La respuesta favorable en el desarrollo de la longitud y ancho de hoja, número de raíces y altura de plántula permitirá una mayor sobrevivencia de las plantas durante la etapa de aclimatización. Por otro lado, *Brassia verrucosa* presento un efecto positivo en su desarrollo en el medio de cultivo suplementado con carbón activado y peptona. Lo anterior pudo deberse por un lado a que el carbón activado fomenta una mayor aireación, establece un ambiente oscuro que propicia el desarrollo de las raíces y absorbe sustancias inhibidoras indeseables como el etileno o los pigmentos tóxicos (Arditti, 1993; Pan y Staden, 1998) y por el otro, a que favorece la inducción de yemas, brotes, el desarrollo de raíces y la proliferación de pseudobulbos (Fridborg *et al.*, 1978; Vij *et al.*, 1984; Waes, 2005; Moraes *et al.*, 2005; Nagaraju y Mani, 2005; Yang *et al.*, 2006).

La población de vainilla presento un polimorfismo promedio de 67.5 % y el dendrograma obtenido con marcadores moleculares tipo RAPD definió cuatro grupos relacionados dentro de la población. En relación al polimorfismo encontrado, éste denota la existencia de variabilidad genética intermedia. Sin embargo Soto-Arenas (1999) al trabajar con material de vainilla procedente del norte del estado de Veracruz y llevar a cabo la caracterización con aloenzimas, encuentra una pequeña variación genética, determinando que el material presente es homocigoto; por otro lado Schluter *et al.* (2007) al evaluar la diversidad y la estructura genética dentro de *Vanilla planifolia* encontraron una alta diversidad genética en un grupo del sur del eje neovolcánico transversal conformado por los estados de Oaxaca, Chiapas y Quintana Roo. El polimorfismo encontrado en el presente estudio pudo deberse a que los esquejes

utilizados en la plantación provienen posiblemente de diversas fuentes tanto del estado de Veracruz como de Oaxaca, principalmente.

Los marcadores moleculares permitieron identificar por sus patrones RAPD a las 26 especies de orquídeas estudiadas, las cuáles presentaron un patrón de bandeo diferente, obteniéndose con ello su huella genética. La asignación de un bandeo particular a cada especie hará posible la identificación rápida de las mismas en estudios posteriores y permitirá su protección. La variabilidad genética existente en los cinco géneros de orquídeas estudiadas fue detectada, el mayor valor (85.4%) lo presentó el género *Laelia* y el menor (35.6%) el género *Lemboglossum*. Lo que denota una mayor variabilidad genética en el género *Laelia*, siendo este valor mayor al reportado por Sun y Wong (2001) en poblaciones naturales de orquídeas *Zeuxine* y *Eulophia* donde el mayor valor obtenido fue de 20.97 %. Los porcentajes de polimorfismo inter e intraespecífico de: *Encyclia hanburyi*, *Encyclia citrina*, *Encyclia polybulbon*; *Laelia autumnalis*, *Laelia speciosa*; *Lemboglossum aptera* (*Rhynchostele aptera*); *Leochilus carinatus*; *Oncidium stramineum*, *Oncidium sphacelatum* y *Oncidium cavendishianum*, fueron detectados. Lo que muestra que el uso de marcadores moleculares RAPD fue eficiente para identificar el polimorfismo inter e intraespecífico, por lo que, los resultados obtenidos son de gran utilidad debido a que no se cuenta con estudios moleculares suficientes que ayuden a explicar la gran diversidad de orquídeas mexicanas.

## CONCLUSIONES GENERALES

Las semillas de la orquídea *Oncidium stramineun* tuvieron una germinación de 47.69 %. El medio de cultivo MS suplementado con 30 g·litro<sup>-1</sup> de sacarosa y 6.5 g·litro<sup>-1</sup> de agar, 100 ml·litro<sup>-1</sup> de agua de coco, 40 g·litro<sup>-1</sup> de extractos de manzana, plátano y jitomate, 2.0 g·litro<sup>-1</sup> de peptona y 200 mg·litro<sup>-1</sup> de polivinil pirrolidona (PVP) resultó adecuado para su propagación *in vitro*. Se observaron siete etapas fenológicas en su desarrollo *in vitro*: imbibición a los cuatro días, semillas verdes a los ocho días, germinación a los trece días, protocormo inicial a los dieciséis días, protocormo tardío a los diecinueve días, desarrollo de hojas a los veintiocho días, desarrollo de raíces verdaderas a los treinta y cuatro días y plántula. La germinación *in vitro* de *Brassia verrucosa* se presentó de forma adecuada, el desarrollo de las plántulas se llevó a cabo en el medio de cultivo MS suplementado con 30 g·litro<sup>-1</sup> de sacarosa, 100 ml·litro<sup>-1</sup> de agua de coco, 40 g·litro<sup>-1</sup> de extractos de manzana, plátano y jitomate, 2.0 g·litro<sup>-1</sup> de peptona, 1.0 g·litro<sup>-1</sup> de carbón activado y 6.5 g·litro<sup>-1</sup> de agar.

Los marcadores tipo RAPD sirvieron para detectar el polimorfismo genético en vainillas provenientes de Papantla, Veracruz, México. El polimorfismo total encontrado fue de 67.5 % lo que sugiere la existencia de variabilidad genética en el material vegetal.

Los marcadores moleculares permitieron identificar por sus patrones RAPD a cada especie estudiada, cada una de las especies presentó un patrón de bandeo diferente, obteniéndose con ello la huella genética de 26 especies de orquídeas. Mediante los marcadores moleculares tipo RAPD se detectó la variabilidad genética existente en los

cinco géneros de orquídeas estudiados, donde el género *Laelia* mostró el mayor valor (85.4 %) y el género *Lemboglossum* el menor (35.6 %). Se determinó el porcentaje de polimorfismo inter e intraespecífico de: *Encyclia hanburyi*, *Encyclia citrina*, *Encyclia polybulbon*; *Laelia autumnalis*, *Laelia speciosa*; *Lemboglossum aptera* (*Rhynchostele aptera*); *Leochilus carinatus*; *Oncidium stramineum*, *Oncidium sphacelatum* y *Oncidium cavendishianum*. Los marcadores moleculares RAPDs pueden servir de herramienta para priorizar las especies de orquídeas a ser conservadas en base a su variabilidad genética.

Los resultados obtenidos en la presente tesis son de utilidad ya que contribuyen al conocimiento de las orquídeas mexicanas, dado que en la literatura no se reportan estudios moleculares suficientes que den una idea de la gran diversidad genética existente.