



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

**RESPUESTAS MORFOGÉNICAS *in vitro* EN LA OBTENCIÓN DE PLANTAS
DE *Cynoches ventricosum* BATEMAN**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias

Presenta:

ELIUD RODRÍGUEZ OLIVERA

Bajo la supervisión de: DR: JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O



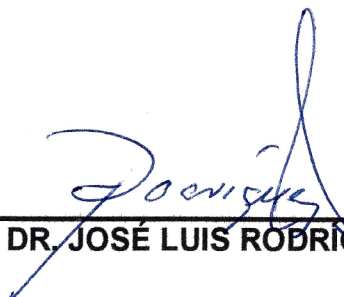
Chapingo, Estado de México, 2022

**RESPUESTAS MORFOGÉNICAS *in vitro* EN LA OBTENCIÓN DE PLANTAS
DE *Cycnoches ventricosum* BATEMAN**

Tesis realizada por **ELIUD RODRÍGUEZ OLIVERA**, bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

DIRECTOR:



DR. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O

ASESOR:



DR. LUIS FERNANDO CONTRERAS CRUZ

ASESOR:



DR. JUAN PORFIRIO LEGARIA SOLANO

Contenido

1	INTRODUCCIÓN GENERAL	13
2	REVISIÓN DE LITERATURA.....	15
2.1	Métodos de propagación	19
2.1.1	Propagación sexual	19
2.1.2	Propagación asexual	20
2.1	Cultivo <i>in vitro</i> de células y de tejidos vegetales.	20
2.1.1	Desinfestación	25
2.1.2	Características de los medios de cultivo	25
2.1.3	Reguladores de crecimiento	26
2.1.4	Otros ingredientes del medio de cultivo.....	27
2.1.5	Literatura citada.....	28
3	ARTÍCULOS CIENTÍFICOS	33

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Lista de tratamientos	37
Cuadro 2: Análisis de varianza de desinfestación de los explantes a los 150 dds con fuente de variación (FV), grados de libertad (GL), suma de cuadrados (SC), cuadrados medios (CM), F calculada (Fc) y P-valor.	40
Cuadro 3: Lista de tratamientos	50
Cuadro 4: Análisis de varianza de desinfestación de los explantes a los 28 dds con fuente de variación (FV), grados de libertad (GL), suma de cuadrados (SC), cuadrados medios (CM), F calculada (Fc) y P-valor.	52
Cuadro 5: Comparación de medias para desinfestación de explantes entre niveles del factor explante a los 28 dds.	52
Cuadro 6. Análisis de varianza de limpieza de explante a 28 dds con fuente de variación (FV), grados de libertad (GL), suma de cuadrados (SC), cuadrados medios (CM), F calculada (Fc) y P-valor.....	53
Cuadro 7. Comparación de medias de limpieza de explante entre los métodos de desinfestación a los 35 dds.....	53
Cuadro 8. Comparación de medias de limpieza de explante entre los niveles del factor explante a los 35 dds.	54
Cuadro 9. ANOVA para respuesta morfogénica a los 35 dds con fuente de variación (FV), grados de libertad (GL), suma de cuadrados (SC), cuadrados medios (CM), F calculada (Fc) y P-valor.....	54
Cuadro 10. Comparación de medias de la respuesta morfogénica entre los niveles del factor explante a los 35 dds.	55
Cuadro 11: Lista de tratamientos	66
Cuadro 12. ANOVA para la desinfestación de explante a los 35 dds con fuente de variación (FV), grados de libertad (GL), suma de cuadrados (SC), cuadrados medios (CM), F calculada (Fc) y P-valor.....	67

Cuadro 13. Comparación de medias de contaminación entre los métodos de desinfestación a los 35 dds.....	68
Cuadro 14. ANOVA para limpieza de explante a los 35 dds con fuente de variación (FV), grados de libertad (GL), suma de cuadrados (SC), cuadrados medios (CM), F calculada (Fc), P-valor.	68
Cuadro 15. ANOVA de la respuesta morfológica a los 35 dds con fuente de variación (FV), grados de libertad (GL), suma de cuadrados (SC), cuadrados medios (CM), F calculada (Fc) y P-valor.....	69
Cuadro 16. Comparación de medias de la respuesta morfológica entre los métodos de desinfestación a los 35 dds.	70
Cuadro 17. Comparación de medias de la respuesta morfológica entre los tipos de siembra a los 35 dds.	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Orquídea <i>Cycnoches ventricosum</i>	16
Figura 2: <i>Cycnoches ventricosum</i> . A. Hábito con inflorescencia. B. Flor masculina completa, vista lateral. C, D. Pétalos y sépalos, vista anterior y posterior. E. Labelo y columna, vista lateral. F. Labelo, vista frontal. G. Columna, vista lateral. H. Columna, vista lateral y frontal. I. Polinario	18
Figura 3: Porcentaje de explantes limpios por tratamientos. Datos promedio a los 150 días.Tipo III	37
Figura 4. Desarrollo de un explante del tratamiento 6. Formación de callo total a los 10 dds e incremento de este a los 35 y 42 dds.	41
Figura 5: Desarrollo de un explante del tratamiento 6. Formación de callo total a los 10 dds e incremento de este a los 35 y 42 dds.	41
Figura 6. Porcentaje de contaminación en los tratamientos. Datos promedio a los 35 días después de la siembra.....	51
Figura 7. Respuesta morfogénica de repetición 2 del tratamiento 2 (T2R2). Condición inicial a los 3 dds y desarrollo a lo largo de las evaluaciones, hasta la obtención de un brote con primordios foliares extendidos (230 dds).....	56
Figura 8. Respuesta morfogénica de repetición 4 del tratamiento 2 (T2R4). Condición inicial a los 7 dds y desarrollo a lo largo de las evaluaciones, hasta la obtención de un brote con primordios foliares (230 dds).....	56
Figura 9: Respuesta morfogénica en hojas. Explantes con crecimiento alrededor de tejido vascular (A) y formación de callo alrededor de tejido vascular (B y C) en T6 a los 35 dds.	71

DEDICATORIA

Este trabajo por demás modesto lo dedico. Al Creador, por la vida que me dio, la razón que todo sea como es.

A mi madre santa y amada la MC. Aida Olivera de los Santos, quien siempre me apoyó, nunca se rindió y me animó en los momentos difíciles, por quien soy quien soy.

A mi padre el Sr. Felipe Rodríguez Grajales.

Y a mis hermanos:

Zabdi

Felipe Nery

Erick

Quienes siempre estuvieron a mi lado, con su apoyo y cariño.

Dedico también esta tesis a mis sobrinas:

Yuritzi Sarahi

Ana Luisa

y la pequeña Alice Sophia.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) Por formarme profesionalmente. Agradezco al departamento de Fitotecnia y a la plantilla de profesores, catedráticos que se comprometieron en brindarme los conocimientos necesarios en mi formación personal y profesional.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) del cual forma parte el Campo Experimental Rosario Izapa (CERI) por aceptarme y permitirme realizar este trabajo de investigación dentro de sus instalaciones, como es el laboratorio de Biotecnología.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico para llevar a cabo la presente investigación.

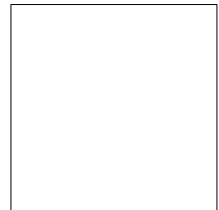
Al Dr. José Luis Rodríguez de la O. Catedrático de la Universidad Autónoma de Chapingo. Responsable del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, por compartir su conocimiento y la dirección de este trabajo.

Al Dr. Leobardo Iracheta Donjuan. Investigador Titular del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias, responsable del laboratorio de Biotecnología, por apoyarme cuando la pandemia impidió que pudiera trabajar en las instalaciones de la escuela.

A mi familia por su apoyo y a la familia Reyes-Olivera (mi tía Elodia, tío Rubén y mis primos Josué, Ulises y Ashanti) quienes me recibieron en su casa y me apoyaron.

Y a todos aquellos que, aun sin saberlo, me apoyaron, mis amigos y compañeros de trabajo, de quienes he recibido ánimos y lecciones que me han permitido culminar esta etapa tan impórtate de mi vida les quiero decir... GRACIAS.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre	Eliud Rodríguez Olivera
Fecha de nacimiento	22 de noviembre de 1995
Lugar de nacimiento	Tabasco-Centro
No. Cartilla militar	D-6530367
CURP	ROOE951122HTCDLL09
Profesión	Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia
Cédula Profesional	11911207

Desarrollo académico

Secundaria José Martí	Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo
Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo	

RESÚMEN GENERAL

EVALUACION DE RESPUESTAS MORFOGÉNICAS *IN VITRO* PARA LA OBTENCIÓN DE PLANTAS DE *Cycnoches ventricosum* BATEMAN

Cycnoches ventricosum pertenece a la familia Orchidaceae, estas especies son muy importantes y muy codiciadas en el mercado de las plantas ornamentales, y actualmente debido a su sobreexplotación se les considera un grupo muy vulnerable y amenazado. La SEMARNAT en el 2010, reportó 188 orquídeas en alguna categoría de riesgo, debido a innumerables factores de afectación en sus hábitats naturales. Otro factor muy importante de afectación es que, *C. ventricosum*, presenta problemas en su propagación, debido a sus semillas carentes de endospermo y por presentar largos periodos juveniles. Además, existe una condición denominada “sportive condition”, que implica la producción de flores masculinas y femeninas en períodos diferentes, lo que también afecta su reproducción sexual. Así se planteó como objetivo, obtener un protocolo de propagación y posterior conservación por cultivo *in vitro*. Evaluando las condiciones y factores que limitan las respuestas morfogénicas, como la desinfestación, tipos de explantes, luz/oscuridad y el uso de reguladores de crecimiento. El medio de cultivo empleado consintió en las sales inorgánicas de Murashige & Skoog (1962). Evaluando tejidos de: pseudobulbos, raíces y hojas. Los resultados fueron limitados, debido a la presencia de hongos y bacterias en los tejidos cultivados y el necrosamiento, lo que impidió la regeneración y desarrollo adecuado y la emisión de nuevos brotes. El establecimiento de tejidos de raíz resultó más favorable, siendo los de la cofia los mejores, al no presentar contaminación, un bajo nivel de necrosamiento y las mejores respuestas organogénicas (PLBs). Los diseños experimentales fueron completamente al azar con arreglo factorial, analizados mediante el software estadístico R.

Palabras clave: orquídea, rescate, propagación.

GENERAL ABSTRACT

EVALUATION OF MORPHOGENIC RESPONSES *IN VITRO* TO OBTAIN PLANTS OF *Cycnoches ventricosum* BATEMAN

Cycnoches ventricosum belongs to the Orchidaceae family, these species are very important and highly coveted in the ornamental plant market, and are currently considered a very vulnerable and threatened group due to their overexploitation. In 2010, SEMARNAT reported 188 orchids in some category of risk, due to innumerable factors affecting their natural habitats. Another very important factor of affectation is that *C. ventricosum* presents problems in its propagation, due to its seeds lacking endosperm and because it has long juvenile periods. In addition, there is a condition called "sportive condition", which implies the production of male and female flowers in different periods, which also affects their sexual reproduction. Thus, the objective was to obtain a protocol for propagation and subsequent conservation by *in vitro* culture. Evaluating the conditions and factors that limit morphogenic responses, such as disinfestation, explant types, light/darkness, and the use of growth regulator. The culture medium used consisted of the inorganic salts of Murashige & Skoog (1962). Tissues evaluated were: pseudobulbs, roots, and leaves. The results were limited, due to the presence of fungi and bacteria in the cultivated tissues and necrosis, which prevented regeneration and adequate development and the emission of new shoots. The establishment of root tissues was more favorable, being those of the coppice the best as they did not present contamination, a low level of

necrosis and the best organogenic responses (PLBs). The experimental designs were completely randomized with a factorial arrangement and analyzed using R statistical software.

Keywords: orchid, rescue, propagation.

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

La orquídea *Cycnoches ventricosum* BATEMAN pertenece a la familia Orchidaceae, la cual es considerada una de las familias más grandes de plantas con flores, con más de 25 000 especies (Chase, Cameron, Freudenstein, Pridgeon, Salazar, Van den Berg y Schuiteman, 2015), principalmente en regiones tropicales (CONABIO, 2013). Estas especies son ampliamente conocidas por su uso ornamental que ha motivado a un extenso público que estudia, cultiva, comercia o colecciona sus especies, a hacerse con ellas, a tal grado que se considera que las orquídeas son un grupo amenazado en México, pues a pesar de que en el país la recolecta y venta de orquídeas silvestres está prohibida, su extracción para venta local e internacional es uno de los mayores problemas (CONABIO, 2013), esto debido a su gran atractivo visual, pues se consideran como flores exóticas. Actualmente, SEMARNAT (2010) reportó unas 188 especies de orquídeas que se encuentran en un grado de amenaza, entre ellas, *C. ventricosum* en la categoría de Amenazada.

Estas especies poseen métodos de propagación sexual y asexual, siendo la propagación sexual (por semilla), la menos eficiente, pues las semillas de orquídeas son muy pequeñas y contienen pocas reservas nutritivas. Usualmente la germinación de las semillas está condicionada a la asociación con un hongo, el cuál abastece a las plantas jóvenes con nutrientes que necesitan hasta que poseen la capacidad para fabricar su propio alimento.

Las orquídeas también presentan un largo y frágil período reproductivo, pues el periodo juvenil puede durar en promedio 3 años y se logra, en la naturaleza, que, de un millón de semillas, solamente germinen 10 a 15 y solo un par de estas alcanzan a ser adultas (Téllez-Velasco, 2011).

La propagación asexual es aquella que se obtiene por secciones de la planta madre; esto genera plantas genéticamente idénticas a la planta madre y se generan a partir de la separación de pseudobulbos o rizomas, keikis, cortes de tallo y cultivo de tejidos (Téllez-Velasco, 2011). Otro método de propagación es

efectuado mediante la técnica de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Esta última es una técnica que permite la regeneración y propagación vegetativa a partir de una parte de la planta, denominada explante, que se coloca en medios de cultivo especiales, dando como resultado la formación de plantas con características similares a la planta de la que se obtuvo el explante. Esto es una gran ventaja para la industria de las flores cortadas para la producción de flores uniformes para satisfacer las demandas del mercado.

El cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales, también nos ha permitido la conservación y propagación de muchas especies, de forma muy eficiente por lo que se ha empleado para rescatar varias especies en peligro, como en el caso de *Bletia urbana*, *Cosmos atrosanguineus*, *Laelia anceps*, *Vanilla planifolia*, *Brassia verrucosa*, *Laelia autumnalis*, entre otras. Contreras & Rosas (1999) reportan una técnica de propagación *in vitro* con la que es posible obtener una producción teórica mínima de 38 mil plantas a partir de un solo explante de yema floral en tan sólo nueve meses de cultivo, para la especie *Phalaenopsis amabilis*. Para el caso de *C. ventricosum*, no se han reportado protocolos de propagación *in vitro* y ya que las respuestas *in vitro* varían, no solo entre especies, sino que incluso entre genotipos (Salazar-Mercado, 2012), por lo que, es necesario generar protocolos específicos para el cultivo *in vitro* de esta especie.

En el presente trabajo se planteó como objetivo, evaluar diferentes condiciones *in vitro* tanto de medios de cultivo, tipos y concentraciones de reguladores y diferentes explantes, para obtener plantas y definir un protocolo efectivo de propagación para *C. ventricosum* en tres experimentos.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

La familia Orchidaceae es considerada una de las familias más grandes de las plantas con flores, contiene aproximadamente 700 géneros y más de 25 000 especies en el mundo (Chase et al., 2015). No obstante, la mayor diversidad de orquídeas se concentra en las regiones tropicales del planeta, en países como Colombia, Ecuador y Perú (CONABIO, 2013). La orquideoflora mexicana está constituida por al menos 168 géneros, 1254 especies y 21 taxa subespecíficos (Soto-Arenas, Gómez & Hágsater, 2007).

Las orquídeas son ampliamente conocidas por su uso ornamental que ha motivado a un extenso público que estudia, cultiva y colecciona sus especies. Básicamente, el comercio de las orquídeas nativas en Chiapas es de manera informal, en parques y mercados, principalmente en municipios como Berriozábal, San Cristóbal de las Casas o Comitán, por lo que la cantidad de plantas y las ganancias que generan su venta son imposibles de cuantificar. En el ámbito productivo, las especies de mayor importancia son del género *Vanilla*; como *Vanilla planifolia* Jacks, de la que es extraída la vainilla, un conjunto de sustancias aromáticas que son usadas para dar sabor y olor (CONABIO, 2013).

El género *Cycnoches* es uno de los más destacados entre la familia Orchidaceae por su notable rasgo de producción de flores dimórficas funcionalmente unisexuales. Incluye aproximadamente 34 especies y se distribuye desde el sur de México hasta Bolivia y el norte de Brasil con una diversidad máxima en Panamá y Colombia (Gerlach & Pérez-Escobar, 2014). Las *Cycnoches* se conocen comúnmente como "orquídeas cisne", debido a la similitud de la esbelta columna curva de flores masculinas con el cuello de un cisne (Figura 1).

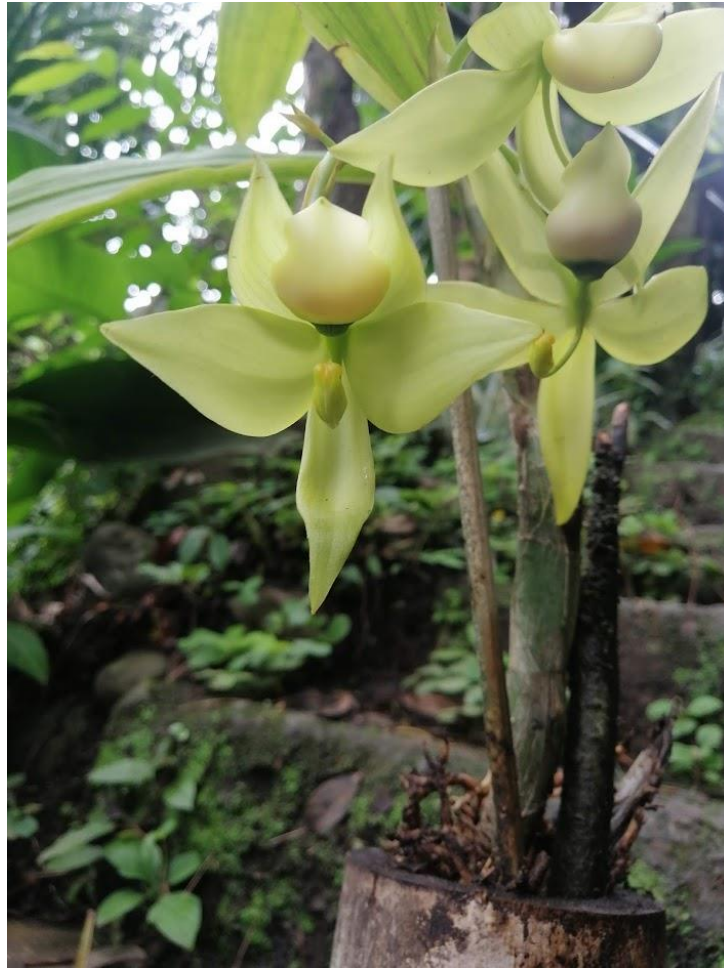


Figura 1: Orquídea *Cycnoches ventricosum*

Las plantas de *Cycnoches* generalmente crecen de manera epífita en los bosques húmedos tropicales de las tierras bajas, desde el nivel del mar hasta los 1,600 m (Gerlach & Pérez-Escobar, 2014). En México, el género *Cycnoches* está representado por *C. egertonianum* y *C. ventricosum* Bateman (Noguera-Savelli & Cetzal-Ix, 2013).

C. ventricosum Bateman es descrita por Noguera-Savelli & Cetzal-Ix (2013) de la siguiente manera: una hierba de más de 60 cm de alto, cespitosa; con raíces de 2 a 4 mm de grosor, teretes, blancas; rizoma corto; pseudobulbos de 23 a 25 cm de largo con 2 a 3.5 cm de grosor, cilíndricos-cónicos, atenuados hacia el ápice, cuando jóvenes son provistos hasta con 10 hojas, caedizas, articuladas a una vaina de 8 a 9 entrenudos; las hojas son de 16 a 40 cm de largo por 5.5 a 6 cm de ancho, de 7 a 9 nervaduras, dísticas, convolutas, plicadas, articuladas, de un

color verde oscuro en el haz y verde claro en el envés; la inflorescencia es de 30 cm largo, una por pseudobulbo, una lateral, originándose de la base de los nodos apicales, arqueadapéndula, racemosa, las flores pueden ser masculinas o femeninas (dioica), son de 8 a 10 cm de diámetro, no resupinadas, fragantes, tépalos amarillo verdosos, labelo blanco con un callo verde oscuro y una mancha verde oscura en la base; sépalo dorsal de 6.5 a 7 cm por 1.5 a 1.6 cm, extendido o reflexo, oblongo-elíptico; los sépalos laterales son de 4.3 a 4.7 cm por 1.5 a 1.6 cm, reflexos, oblongo-elípticos a ovados; los pétalos son de 5 a 5.3 cm por 2 a 2.2 cm, extendidos o reflexos, ovado-elípticos, subagudos; el labelo de 4.2 a 4.5 cm por 1.6 a 1.7 cm, unguiculado, entero, disco ovalado, acuminado, carnosos; columna de 4.5 a 5 cm de largo, arqueada, subterete, ápice dilatado; clinandrio tridentado, los dientes laterales 3 a 3.2 por 1 a 1.5 mm, subtriangulares, agudos, incurvados, diente medio linear, agudo, de 2 a 2.3 mm de largo; la cavidad estigmática es de 4 por 5 mm, obpentagonal; antera de 4 por 4 mm, bidentada ventralmente; polinario con 2 polinios obovoides, estípites laminar, viscidio transversamente oblongo (Figura 2).

C. ventricosum, coloquialmente conocida como “Cisne Verde” o “Bastón de San José”, se encuentra en la categoría de Amenazada por la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010), debido a su sobre recolección para usos ornamentales por lo exuberante de sus flores, junto a otras 187 especies de orquídeas que complementariamente a otras especies, se reportan en total 987 especies que están en alguna categoría de riesgo (Extintas, En Peligro de Extinción, Amenazadas o Sujetas a Protección Especial), dando a entender que estas especies podrían llegar a encontrarse en peligro de desaparecer a corto o mediano plazo.

Si bien, las orquídeas poseen estrategias para de forma sexual y/o asexual, algunas de ellas no son muy eficientes.

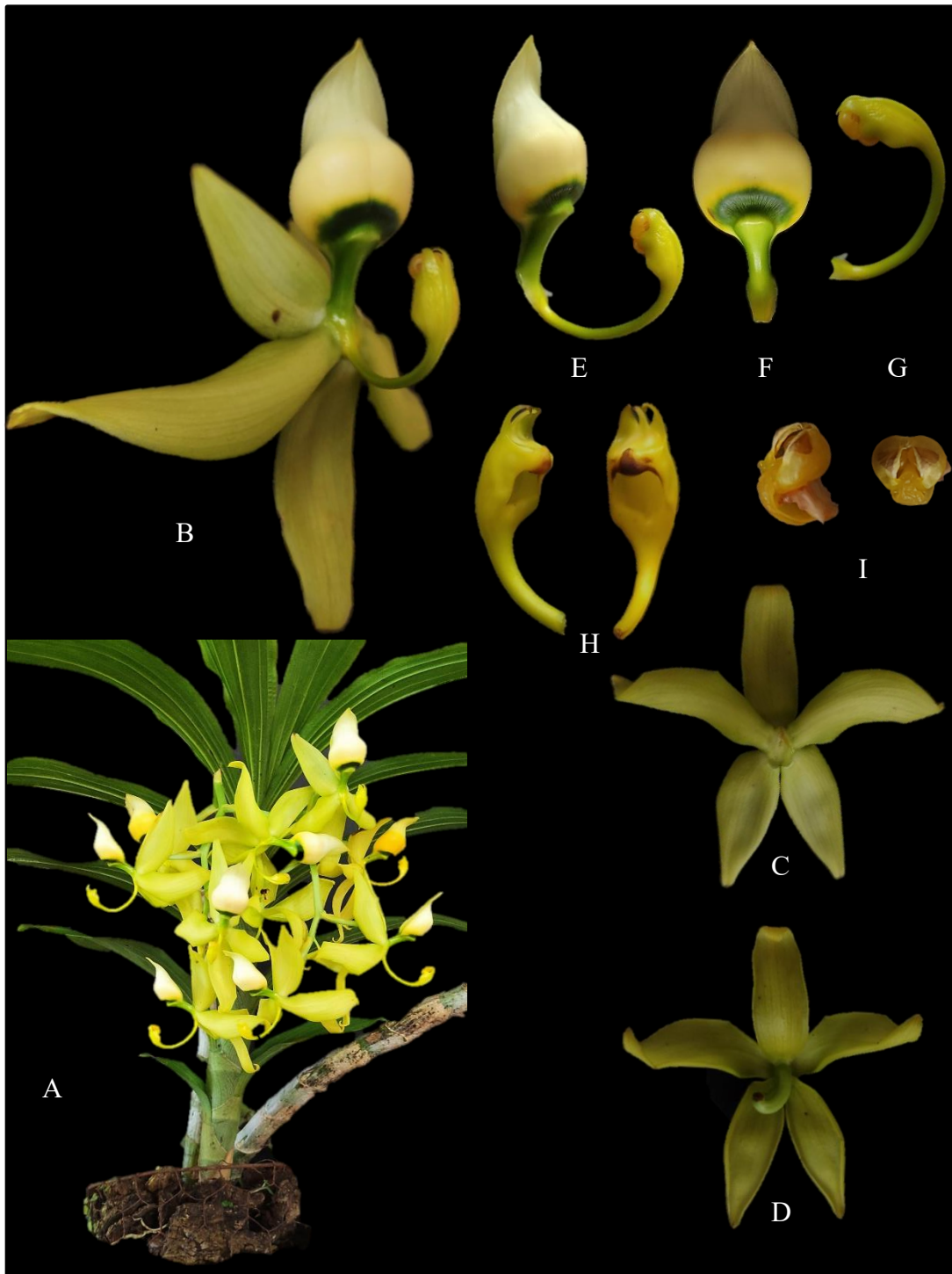


Figura 2: *Cynoches ventricosum*. A. Hábito con inflorescencia. B. Flor masculina completa, vista lateral. C, D. Pétalos y sépalos, vista anterior y posterior. E. Labelo y columna, vista lateral. F. Labelo, vista frontal. G. Columna, vista lateral. H. Columna, vista lateral y frontal. I. Polinario

2.1 Métodos de propagación

2.1.1 Propagación sexual

La propagación sexual de las orquídeas consiste en la producción de nuevas plantas a partir de sus semillas. Este tipo de multiplicación implica un entrecruzamiento genético, ya que es necesaria la participación de los gametos femeninos y masculinos (óvulos y granos de polen). Las semillas de orquídeas son conocidas usualmente como semillas polvo debido a que son muy pequeñas con dimensiones de 1.0 a 2.0 mm de largo y 0.5 a 1.0 mm de ancho (Billard, Dalzotto & Lallana 2014), carecen de endospermo, presentan sólo una testa y un embrión inmaduro. Es por esto que la germinación natural de estas semillas requiere de una relación obligada con hongos micorríticos, pues al carecer de un tejido de reserva (endospermo) que sustente al embrión y permita su desarrollo, el hongo abastece a las semillas con azúcares y nutrientes necesarios para el desarrollo de las plántulas (Arditti, 1984). Cuando la semilla germina, produce una masa indiferenciada de células de forma esférica llamada protocormo. Manteniendo las condiciones normales las plantas continuarán su crecimiento por varias semanas, meses o incluso años, dependiendo de la especie, hasta que alcance la edad apropiada para producir raíces y las primeras hojas (Téllez-Velasco, 2011).

Las orquídeas presentan un largo y frágil período reproductivo, de modo que en la naturaleza, de un millón de semillas solamente germinen 10 a 15 y alcancen a ser adultas una o dos de ellas; todo este ciclo juvenil puede durar de tres a cinco años (Rodríguez, González Alvarado & Telles 2007), lo que nos indica que una población de orquídeas afectada dentro de un bosque, puede tardar mucho tiempo en restablecerse, por lo que con un mal manejo este recurso se vería afectado rápida e irreversiblemente, sobre todo si incluimos efectos adversos como destrucción natural, enfermedades por hongos o bacterias, sequías, incendios, tala indiscriminada, depredación y contrabando de especies (Damon, Aguilar, Rivera & Nikolaeva, 2004).

2.1.2 Propagación asexual

En este tipo de propagación no hay intercambio de gametos, las plantas nuevas generadas son genéticamente idénticas a la planta madre (clones) y se generan a partir de sus partes (Téllez-Velasco, 2011), algunos son:

Pseudobulbos: Las orquídeas de crecimiento simpodial forman por lo general un pseudobulbo nuevo por cada año. Cuando la planta ha crecido lo suficiente y se constituye por un grupo de ellos, pueden dividirse para conformar otra planta dejando tres o cuatro pseudobulbos en cada una de ellas para su correcto desarrollo.

Corte de tallos. En orquídeas simpodiales del tallo único a menudo se forman raíces aéreas, un ejemplo de esta forma de propagación es la vainilla que es una orquídea comercial que se propaga por corte de tallos llamados esquejes.

Rizomas. El rizoma son tallos horizontales de donde se originan los pseudobulbos; en algunas especies son muy cortos y en otros son muy evidentes.

Raíces. Algunas orquídeas monopodiales como *Epidendrum raniferum* o *Sobralia*, forman brotes nuevos junto a sus raíces; para separar una planta nueva son necesarias raíces propias desarrolladas con alrededor de 15 cm de longitud para su absorción y sobrevivencia.

Keikis. La palabra keiki es un vocablo hawaiano que significa “bebé”. Esta estructura corresponde a una plántula que se desarrolla en las varas florales, en los pseudobulbos o en las raíces de la planta madre y que suele presentarse bajo algunas condiciones ambientales después de la floración. Los keikis son más propensos a desarrollarse en algunos géneros como *Phalaenopsis* y *Dendrobium* así como en orquídeas silvestres como *Leuchilus carinatus* y *Sobralia decora*.

2.1 Cultivo *in vitro* de células y de tejidos vegetales.

El cultivo *in vitro* de tejidos, es una herramienta de tipo biotecnológico que permite tanto la obtención y propagación de plantas a partir del uso de ambientes controlados y utilizando pequeñas fracciones de tejidos de plantas, llamados explantes, éstos se colocan en medios de cultivo específicos bajo la influencia de diferentes tipos de reguladores del crecimiento; buscando promover en los tejidos cultivados la característica llamada “totipotencia celular” lo que permite obtener y multiplicar plantas completas a una elevada escala, manteniendo la identidad genética de la planta madre. Generalmente, como explantes, se utilizan porciones de hoja, de raíz, o yemas axilares de los tallos o de tejidos con zonas de crecimiento acelerado llamadas meristemas. En cultivo *in vitro* es posible realizar la propagación, tanto sexual como asexual de las orquídeas. En la propagación sexual, el cultivo *in vitro* puede dar una mayor seguridad en la germinación de las semillas, lo cual puede realizarse de dos maneras: germinación simbiótica y asimbiótica:

La germinación simbiótica consiste en la siembra de semillas en presencia del hongo específico que realiza la asociación micorrízica apropiada con la orquídea. El hongo crece en el medio, coloniza a las semillas en proceso de germinación y se origina una relación simbiótica que alimenta al protocormo hasta que éste produce hojas y se vuelve autotrófico. Esta técnica es ampliamente usada para la propagación de orquídeas terrestres en zonas templadas. La germinación simbiótica tiene la ventaja de utilizar un medio simple (entre los más comúnmente usados está la avena en polvo con un poco de extracto de levadura), y como resultado las plantas micorrizadas suelen ser más fuertes y resistentes a infecciones que sus contrapartes cultivadas asimbióticamente. Sin embargo, la desventaja es que se necesita aislar y seleccionar el tipo de hongo adecuado para que se origine la simbiosis y prevenir el parasitismo y la consecuente muerte de las semillas. Una limitante de esta práctica, es la poca investigación sobre la relación de los hongos micorrízicos con las orquídeas tropicales, por lo que no se dispone de dichos hongos para la germinación de muchas especies (Téllez-Velasco, 2011).

La germinación asimbiótica surge por el afán de geminar orquídeas sin necesidad de micorrizas. Las investigaciones de Bernard y Burgeff sugirieron a Lewis Knudson que la germinación de las semillas se podía efectuar sin la necesidad de una micorriza, siempre que el embrión recibiera los nutrientes indispensables para su desarrollo, lo que llevó a que Knudson desarrollara los primeros métodos de germinación asimbiótica de orquídeas, mediante los medios de cultivo Knudson B en 1922 y Knudson C en 1946 (Téllez-Velasco, 2011).

Por varias razones este descubrimiento fue uno de los más importantes eventos para la propagación de orquídeas hasta nuestros días. Las tasas de germinación se incrementaron exponencialmente y se volvieron más predecibles; en consecuencia, la cantidad de híbridos y plantas de orquídeas en circulación aumento súbitamente, disminuyendo los precios y reduciéndose la importación de plantas de los trópicos. El medio usado para la germinación asimbiótica es más complejo que para la germinación simbiótica, ya que todos los nutrientes, orgánicos e inorgánicos, y los azúcares deben estar disponibles para la orquídea en una forma apropiada puesto que ya no existe la intermediación del hongo. Finalmente, esta metodología es el más práctico procedimiento para la preservación de cultivares deseables y de especies de orquídeas en proceso de extinción (Pridgeon, Philips, Cribb, Chese & Rasmussen 1999). Actualmente la germinación asimbiótica es un método ampliamente empleado en distintas especies.

Si bien Knudson desarrolló los primeros métodos de propagación *in vitro* de orquídeas, a través de germinación asimbiótica en 1922 y 1949. La propagación *in vitro* para generación de plántulas de orquídeas para usos hortícolas era despreciada en su momento debido al largo período juvenil antes de la floración. Por otro lado, las orquídeas son exógamas y su propagación mediante semillas conduce a la producción de plantas heterocigotas, por lo que surge un interés por los protocolos de propagación asexual a fin de obtener plantas uniformes o clones (Chugh, Guha & Rao, 2009).

Se considera que Rotor de la Universidad de Cornell fue el primer en demostrar que se podían inducir plántulas mediante el cultivo aséptico de las yemas latentes en los nodos basales de la inflorescencia de *Phalaenopsis* en 1949; Posteriormente Thomale en 1957 obtuvo 'plántulas usando como explantes secciones de tubérculos de *Orchids maculata* que contenían yemas y describió el potencial del cultivo de tejidos como un medio de propagación clonal rápido de orquídeas. Tres años más tarde, Morel cultivó puntas de brotes para obtener clones de *Cymbidium* libres de virus *in vitro*. Unos años después, Wimber, en 1963, publicó el primer protocolo detallado para la producción *in vitro* de *Cymbidium* comenzando con el cultivo de meristemos (Téllez-Velasco, 2011).

El término estructuras similares a protocormos (PLB: protocorm-like bodies) se utiliza como referencia a la reproducción asexual productora de protocormos, característica de las orquídeas. La principal diferencia entre el proceso de germinación y el de reproducción sexual, que incluye el proceso de fecundación, embriogénesis cigótica, seguido de la germinación y formación de protocormos, es que las PLB provienen de tejidos somáticos, por lo que se considera un tipo de propagación vegetativa. La producción de PLB, por lo tanto, se puede comparar con un tipo específico de embriogénesis somática que ocurre en las orquídeas, y la anatomía, el desarrollo y las características de las células y algunos marcadores de la pared celular al comienzo de la formación de PLB son similares a los del desarrollo de protocormos en orquídeas (Cardoso, Zanello & Chen 2020).

En las orquídeas, se sugiere que los PLB sean embriones somáticos debido a la similitud morfológica y el patrón de desarrollo observado entre ellos y los embriones cigóticos (Cardoso et al., 2020).

La principal ventaja de la propagación clonal es que las plántulas producidas mantienen las características idénticas a las plantas originales. Esto es una gran ventaja para la industria de las flores cortadas en la producción de flores uniformes durante períodos predecibles para satisfacer las demandas del mercado. Además, las orquídeas son de crecimiento lento por naturaleza; su

crecimiento y desarrollo están marcadamente influenciados por condiciones microclimáticas. En los trópicos, las plántulas de orquídeas pueden tardar más de dos años en alcanzar la etapa de floración (Chugh et al., 2009).

Contreras & Rosas (1999) reportaron una técnica de propagación *in vitro* con la que es posible obtener una producción teórica mínima de 38 mil plantas a partir de un solo explante de yema floral en tan sólo nueve meses de cultivo, para la especie *Phalaenopsis amabilis*.

Las diferentes técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* nos han permitido la conservación y propagación de muchas especies, de forma muy eficiente por lo que se ha empleado para rescatar varias especies en peligro. En orquídeas se han reportado múltiples protocolos de propagación exitosos, en México, el Dr. Víctor Chávez de la UNAM, así como el Dr. Martín Mata del INECOL, han desarrollado más de 30 protocolos de cultivo de tejidos para desarrollo y regeneración de orquídeas amenazadas o en peligro de extinción (Téllez-Velasco, 2011).

Para el caso de *C. ventricosum* no se han reportado protocolos de propagación *in vitro* y ya que la respuesta al cultivo *in vitro* varía no solo entre especies, sino que incluso entre genotipos (Salazar-Mercado, 2012), es necesario generar protocolos específicos para el cultivo *in vitro* de esta especie.

El proceso de micropropagación de plantas consta de cinco etapas (Sharry, Adema & Abedini, 2015):

- 1) Precultivo, tratamiento de desinfestación de la planta madre previo al establecimiento,
- 2) Establecimiento, proceso de desinfestación y establecimiento del cultivo,
- 3) Multiplicación: implica el incremento o multiplicación masiva de plantas,
- 4) Enraizamiento: se induce el desarrollo de raíces y
- 5) Aclimatación: Etapa en la que se busca adaptar las plantas producidas *in vitro* a vivir fuera de esa condición y su sobrevivencia en invernadero.

2.1.1 Desinfestación

Uno de los principales problemas en el cultivo *in vitro*, es la presencia de contaminantes como hongos o bacterias que portan los explantes en forma superficial o en forma sistémica. Es por ello por lo que las plantas madre, de las que tomaremos los explantes, deberán llevar un periodo de desinfestación previo al cultivo *in vitro*, de modo que estas deben ser identificadas y preferentemente reubicadas en un invernadero, ya que al menos por tres o cuatro semanas antes de trasladar al laboratorio, los explantes y planta en general deben ser rociados con soluciones fungicidas y bactericidas. Una vez en laboratorio, reciben un tratamiento de desinfestación más riguroso y específico de acuerdo con el explante. En un principio se realiza una limpieza externa con jabón comercial, Tween o alcohol y luego una desinfestación con hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio (CaClO), u otro agente desinfectante.

Una vez llevado a cabo la desinfestación, el material puede pasar a las etapas de establecimiento y multiplicación, en donde el medio de cultivo juega un papel fundamental.

2.1.2 Características de los medios de cultivo

El éxito del cultivo *in vitro* reside en la correcta formulación del medio de cultivo para ciertos explantes, ya que no todos los explantes responderán de igual manera. Un medio de cultivo debe llevar los nutrientes necesarios para el desarrollo de los nuevos órganos, así como hormonas que induzcan la generación de estos órganos, aunque no todas las orquídeas requieren de reguladores de crecimiento para la germinación, ya que generalmente los embriones contienen concentraciones endógenas de hormonas para iniciar su desarrollo (Sharry et al, 2015). Si bien la proporción de sus componentes depende de cada especie, los medios de cultivo base que sobresalen en el cultivo *in vitro* de orquídeas son, el medio MS de Murashige & Skoog, el medio KC de Knudson y el medio VW de Vacin & Went.

2.1.3 Reguladores de crecimiento

Auxinas: ácido indol-acético (AIA), ácido naftalen-acético (ANA), ácido indol-butírico (AIB), ácido 2,4-Dicloro-fenoxiacético (2,4-D). Este grupo de fitoreguladores, cuyo nombre proviene del término griego “auxein” y que significa “crecer” (Lluna, 2006), promueven el alargamiento de las células de coleóptilos y vástagos; también se le atribuye relación al fototropismo, gravitropismo en vástagos y raíces; crecimiento y ramificación de raíces; dominancia apical; desarrollo de tejidos vasculares; desarrollo de frutos; retraso de senectud en las hojas y frutos; producción de etileno en frutos.

Pedroza (2009), demostró que la adición de AIA ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) al medio de cultivo MS promovía las fases del desarrollo en *Epidendrum elongatum*. Cazarez-Favela, de Jesús, Solís, Díaz-, Nájera & Montoya (2016) reportan que el medio MS suplementado con $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA promueven el alargamiento de raíces en *Prosthechea citrina*.

Citocininas: benciladenina (BA) o 6- bencilaminopurina (BAP), kinetina (KIN). Estos compuestos se han encontrado de manera natural, en todas las plantas, particularmente en los tejidos que se dividen de forma activa como meristemas, semillas en germinación, frutos en maduración y raíces en desarrollo. Se han detectado tanto en el floema como en el xilema y su vía acropétala, desde el ápice de la raíz hasta los tallos (Lluna, 2006). Estas hormonas promueven el brote de yemas laterales; retraso de la senectud de las hojas; promoción de la división celular, estimulación del desarrollo de frutos, endospermo y embrión.

El equilibrio de concentración de BA y ANA es importante en la formación de PLB, ya que, la combinación de BAP ($1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y ANA ($0.15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) favorece el desarrollo de hojas y raíces nuevas, obteniendo un promedio de 6.75 plántulas por explante (protocormos obtenidos de semillas de *Prosthechea citrina*) (Santos-Hernández, Martínez, Campo & Aguirre, 2005).

Giberelinas: ácido giberélico (GA₃). Actualmente se han identificado químicamente más de 90 giberelinas aisladas de tejidos vegetales. Las giberelinas son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en puntas de las raíces y semillas en desarrollo. Esta hormona muestra un movimiento por el floema junto con los productos de la fotosíntesis y también por el xilema de forma bidireccional y se podría calificar como pasivo. Se le atribuye que influyen en la germinación de semillas y brote de yemas; alargamiento de tallos; estimulación de la floración y desarrollo del fruto (Lluna, 2006).

Ácido abscísico (ABA): fue identificada en los 1960s tras estudios realizados sobre la abscisión de frutos y la dormancia de yemas por un grupo liderado por F. Addicott, que aisló compuestos que provocaban la abscisión de frutos de algodón y en 1963 identificaron una de ellas, abscisina II, mejor conocida como ABA (Jordán & Casaretto, 2006). Desde entonces, ABA ha sido implicada en múltiples procesos fisiológicos como regulación de crecimiento, dormancia de semillas, germinación, senescencia, división celular, control de la apertura de estomas y respuestas a estreses ambientales como sequía, salinidad, baja temperatura, ataque por patógenos y radiación ultravioleta.

2.1.4 Otros ingredientes del medio de cultivo

Carbón activado. Tisserat y Jones (1999) reportaron que la exudación de fenoles fitotóxicos durante el cultivo de tejidos de orquídeas constituye un serio problema para su cultivo *in vitro*, y que la vía más efectiva para solucionar este problema es realizar cambios frecuentes al medio de cultivo y/o añadir carbón activado.

Arditti (2010) plantearon que entre las posibles explicaciones al efecto positivo que ejerce el carbón activado en el cultivo de tejidos de orquídeas se encuentra el aumento de la aireación del medio de cultivo. Una segunda razón es que absorbe el etileno el cual puede inhibir el crecimiento y la diferenciación, y basado en el estudio de las características de absorción y cambios que se producen en el medio de cultivo durante la esterilización el carbón activado absorbe el 5-

hidroximetilfurfural que se forma por la deshidratación de la sacarosa durante este proceso el cual es inhibidor del crecimiento, así como productos fenólicos y carboxílicos producidos por los tejidos (Rodríguez et al., 2007).

Agua de coco. Las sustancias identificadas en el agua de coco, hasta ahora, incluyen aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos nucleicos, purinas, azúcares, alcoholes de azúcar, vitaminas, sustancias de crecimiento y minerales. Se ha encontrado que el líquido tiene alguna actividad auxina que aumenta con la autoclave, probablemente porque cualquiera de estas sustancias de crecimiento existe en forma unida y se libera por hidrólisis. En los medios modernos, donde los compuestos orgánicos a menudo se agregan en cantidades definidas, el principal beneficio del uso de la leche de coco se debe casi con certeza a que proporciona sustancias de crecimiento de citoquininas naturales altamente activas. La estimulación efectiva solo ocurre cuando se agregan cantidades relativamente grandes a un medio; la incorporación de un 10-15 por ciento en volumen es bastante habitual. Debido a que la leche de coco contiene citoquininas naturales, agregarla a los medios a menudo tiene el mismo efecto que agregar una citoquinina reconocida (George et al., 2008).

2.1.5 Literatura citada

- Arditti, J. (1984). An history of orchid hybridization, seed germination and tissue culture. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 89(4), 359–381.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1984.tb02567.x>
- Arditti, J., (2010). Plenary presentation: history of orchid propagation. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 18, 171–174.
- Billard, C. E., Dalzotto, C. A., & Lallana, V. H. (2014). Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *Oncidium*. *Polibotánica*, 38, 145-157.

- Cardoso, J. C., Zanello, C. A., & Chen, J. T. (2020). An overview of orchid protocorm-like bodies: mass propagation, biotechnology, molecular aspects, and breeding. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 985-1016.
- Cazarez-Favela, T. L., Graciano-Luna, J. de J., Solís-González, S., Díaz-Ramírez, B., Nájera-Luna, J. A., & Montoya-Ayón, J. B. (2016). Propagación *in vitro* de la orquídea *Prosthechea citrina* (La Llave & Lex.) W. E. Higgins nativa del estado de Durango, México. *Investigación y Ciencia de La Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 67, 19–25. <https://doi.org/10.33064/iycuaa2016672269>
- Chase, M. W., Cameron, K. M., Freudenstein, J. V., Pridgeon, A. M., Salazar, G., van den Berg, C., & Schuiteman, A. (2015). An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 177(2), 151–174. <https://doi.org/10.1111/boj.12234>
- Chugh, S., Guha, S., & Rao, I. U. (2009). Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*, 122(4), 507-520.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2013. La biodiversidad en Chiapas: Estudio de Estado. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad/Gobierno del Estado de Chiapas. México.
- Contreras, C. V., & Rosas, H. G. (1999). Micropropagación de *Phalaenopsis amabilis* (Linnaeus) Blume variedad White Grull. *Ciencia ergo-sum*, 6(1), 57-61.
- Damon, A., Aguilar-Guerrero, E., Rivera, L., & Nikolaeva, V. (2004). Germinación *in vitro* de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México. *Revista Chapingo Serie*

- Gerlach, G., & Pérez-Escobar, O. A. (2014). Looking for missing swans: phylogenetics of *Cycnoches*. *Orchids*, 83, 434-437.
- Jordán, M. & J. Casaretto. (2006). Hormonas y reguladores del crecimiento: etileno, ácido abscísico, brasinoesteroides, poliaminas, ácido salicílico y ácido jasmónico. In F. A. Squeo, & L. Cardemil (Eds.). *Fisiología vegetal*. Ediciones Universidad de La Serena. Recuperado desde: <http://listas.exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Etileno,aba,jasmonico,brasino,.pdf>
- Lluna D., R. (2006). Hormonas vegetales: crecimiento y desarrollo de la planta. *Horticultura*, pp. 22-26. Recuperado desde: <https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Reguladores%20genetico.pdf>
- Montoya H., L. M. (1991). *Cultivo de tejidos vegetales*. Medellín: Universidad Nacional de Colombia. 77 p.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Noguera-Savelli, E., & Cetzal-Ix, W. (2013). Primer registro de *Cycnoches ventricosum* (Orchidaceae: Catasetinae) para Tabasco, México. *Botanical Sciences*, 91(2), 233-236. <https://doi.org/10.17129/botsci.418>
- Pedroza M., J. A., Serrato-Muñoz, L. C., & Castaño-Robayo, M. (2010). Efecto del carbón activado y ácido indol acético en el desarrollo de protocormos de *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl. y *Maxillaria*

nutans Lindl. *in vitro*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(2), 86-102.

Pridgeon, A. M.; Crib, P. J.; Chase, M. W. & Rasmussen, F. N. 1999. *Genera Orchidacearum*. Volume 1. General introduction, Apostasioideae, Cyripedioideae. Oxford University Press. Oxford, UK. 352 p

Rodríguez, L., González, R., Alvarado, K., & Telles, E. (2007). Germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de orquídeas silvestres. *Biotecnología Vegetal*, 7(3): 139 - 142

Santos-Hernández, L., Martínez-García, M., Campos, J. E., & Aguirre-León, E. (2005). *In vitro* propagation of *Laelia albida* (Orchidaceae) for conservation and ornamental purposes in Mexico. *HortScience*, 40(2), 439–442. <https://doi.org/10.21273/hortsci.40.2.439>

SEMARNAT. (2010). *Norma Oficial Mexicana. NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección Ambiental-Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestres-Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio-Lista de especies en Riesgo. Diario Oficial de La Federación*, 78.

Sharry, S.; Adema, M. & Abedini, W. (2015). Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. In S. Sharry, M. Adema & W. Abedini (Eds.). Universidad Nacional de La Plata.

Soto-Arenas, M. Á., Gómez, R. S., & Hágsater, E. (2007). Risk of extinction and patterns of diversity loss in Mexican orchids. *Lankesteriana*, 7(1–2), 114–121. <https://doi.org/10.15517/lank.v7i1-2.18449>

Téllez-Velasco M. Á. A. (2011). *Diagnóstico de la familia Orchidaceae en México*. Universidad Autónoma de Chapingo. Edo. de México, México. 181 p.

Tisserat, B. & Jones, D. (1999). Clonal propagation of orchids. In R. D. Hall (Ed.). *Plant cell culture protocols: Methods in molecular biology* (pp. 127-134). Humana Press Inc.

3 ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

CULTIVO *IN VITRO* DE PSEUDOBULBOS DE LA ORQUIDEA *Cycnoches ventricosum* BATEMAN

***IN VITRO* CULTURE OF PSEUDOBULBS OF THE ORCHID *Cycnoches ventricosum* BATEMAN²**

RESÚMEN

La orquídea *Cycnoches ventricosum*, es ubicada en la categoría de Amenazada, de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT (2010) debido a diversos problemas, debidos a su biología de semillas y a los de su propagación, aunado a la destrucción de su hábitat natural. Por lo que, se planteó como objetivo obtener un protocolo de cultivo de tejidos *in vitro* para su propagación y posterior conservación. Las estrategias experimentales incluyeron, evaluar las condiciones y factores que limitan las respuestas *in vitro*. Las estrategias empleadas, se dirigieron inicialmente con tres métodos de desinfestación, y hacia la promoción y emisión de nuevos brotes adventicios, evaluando tres tipos de explantes del pseudobulbo y cultivados en medios de cultivo con las sales inorgánicas de Murashige & Skoog MS (1962), sin reguladores. Las respuestas morfogénicas, fueron muy limitadas, debido a la presencia de organismos contaminantes como hongos y bacterias en los tejidos explorados. Otro factor asociado que limitó las respuestas fue el necrosamiento de los tejidos, lo que impidió la regeneración y desarrollo adecuado de la emisión de nuevos brotes nuevos. El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial, analizado mediante el software estadístico R.

Palabras Clave: micropropagación, rescate, explantes.

ABSTRACT

The orchid *Cycnoches ventricosum*, is located in the category of Threatened, according to NOM-059-SEMARNAT (2010) due to various problems, due to its seed biology and its propagation, coupled with the destruction of its natural habitat. . Therefore, the objective was to obtain an in vitro tissue culture protocol for its propagation and subsequent conservation. The experimental strategies included evaluating the conditions and factors that limit responses in vitro. The strategies used were initially directed with three methods of disinfection, and towards the promotion and emission of new adventitious shoots, evaluating three types of explants of the pseudobulb and cultivated in culture media with the inorganic salts of Murashige & Skoog MS (1962), without regulators. The morphogenic responses were very limited, due to the presence of contaminating organisms such as fungi and bacteria in the explored tissues. Another associated factor that limited the responses was the necrosis of the tissues, which prevented the regeneration and adequate development of the emission of new new shoots. The experimental design was completely randomized with a factorial arrangement, analyzed using the statistical software R.

Key Words: micropropagation, rescue, explants.

INTRODUCCIÓN

Cycnoches ventricosum, es una orquídea con serios problemas de propagación, siendo que, además de compartir un periodo largo juvenil y ausencia de endospermo en las semillas, presenta una condición denominada “sportive condition”, que significa que produce flores masculinas y femeninas en períodos diferentes (Gerlach, 2013) por lo que su reproducción sexual se ve aún más complicada, por esto y debido tanto al saqueo, como a la destrucción de áreas naturales, esta especie como muchas otras, ha sido catalogada como una especie en peligro por la SEMARNAT (2010), entrando en la categoría de amenazada. De modo que es importante generar opciones de conservación y propagación de estas especies, para lo cual se ha empleado muy frecuentemente

la técnica de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, ya que nos permite multiplicar plantas a partir de células y de casi cualquier tipo de tejido vegetal.

Inicialmente se han hecho esfuerzos para usar nodos de tallos florales para la propagación clonal de orquídeas, sin embargo, estos métodos no tuvieron mucho éxito y fueron abandonados, en parte se parecían a los procedimientos de cultivo de tejidos actuales porque las secciones de tallo se cultivaban en un sustrato de musgo (no estéril). Los esfuerzos para lograr la propagación clonal se renovaron poco después que Rotor obtuviera plántulas a partir de nodos florales en medio Knudson C en 1949 (Arditti, 1984).

La base de los métodos actuales generalizados de propagación clonal rápida masiva a través de cultivos de meristemo (o ápices) se estableció en 1946, cuando Ball informó sobre el cultivo de puntas de brote de *Tropaeolum* y *Lupinus*. Estos métodos fueron posteriormente utilizados por Morel en Francia para cultivar puntas de brotes de orquídeas en 1952 y esto revolucionó la industria de las orquídeas (Arditti, 1984).

En este estudio se evaluaron diferentes factores como fueron métodos de desinfestación, medios de cultivo, tipo de explantes, formas de siembra y condiciones de luz en la respuesta morfogénica de diferentes explantes como son el brotes, hojas y raíces de *Cycnoches ventricosum*.

METODOLOGÍA

Material Biológico

Plantas madre se colectaron de la reserva ecológica de “El Triunfo”, Santa Rita de las Flores, Mapastepec, Chiapas. Estas fueron llevadas al Laboratorio de Biotecnología del Campo Experimental Rosario Izapa (CERI), del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícola y Pecuarias (INIFAP) en Tuxtla Chico, Chiapas, en donde se obtuvieron las primeras respuestas morfogénicas. Las actividades se realizaron en el periodo de 15 de febrero al 16 de agosto del 2021.

Los explantes, luego, fueron trasladados al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), con dirección en Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, México. C.P. 56230, en donde se le dio seguimiento.

Para este experimento se emplearon ocho brotes de *Cycnoches* de aproximadamente 3 a 7 cm, los cuales se sometieron a tres métodos de desinfestación y se establecieron en medio de cultivo MS (Anexo 1).

Método de desinfestación

- **Método 1 (3x NaClO):** Los brotes se sumergieron en alcohol al 70 % (30 s), seguido de tres enjuagues con agua destilada esterilizada, después se aplicaron tres lavados consecutivos con NaClO (Cloralex®) a diferentes concentraciones (v/v) y tiempos, en una adaptación a Lee-Espinosa et al. (2008):
 - 1: primero los brotes se someten a NaClO al 10 % por 20 min,
 - 2: en segunda instancia se pasa a NaClO al 5 % por 10 min y
 - 3: finalmente los brotes se sumergen en NaClO al 2% por 2 min.
- **Método 2 (NaClO+Fungicda):** Los brotes se sometieron a una solución fungicida de Promyl-Agygent ($1 \text{ g} \bullet \text{L}^{-1}$ c/u) en agitador orbital a 110 rpm por 1 h, luego de esto, los brotes se sumergieron en una solución de alcohol al 70 % por 30 s y se le aplican 3 enjuagues con agua destilada esterilizada, enseguida de desinfestación con NaClO al 0.6 % por 10 min de acuerdo con Coutiño-Cortés (2016).
- **Método 3 (NaClO+Fungicda+Bactrim):** se empleó el método de desinfestación 2 y los explantes se establecieron en un medio de cultivo MS con BACTRIM® ($80 \text{ mg} \bullet \text{L}^{-1}$), en el cual permanecieron durante dos semanas, después de lo cual, se subcultivaron en medio MS.

Una vez desinfectados, los pseudobulbos de los brotes se cortaron para obtener tres tipos de explante:

Tipo de explante:

- **Tipo I:** ápice de 5 mm de longitud, se sembraron con el corte sobre el medio de cultivo
- **Tipo II:** de la parte media del brote se obtuvieron discos de 3mm de longitud con 1 o 2 yemas, colocando la parte del corte sobre el medio de cultivo, conservado la polaridad
- **Tipo III:** de la parte basal del brote, se obtuvieron explantes tipo 2 y se cortaron a la mitad, de modo que el corte longitudinal quedó sobre el medio de cultivo.



Los explantes viables se subcultivaron cada 24 días, distribuidos en tres medios de cultivo sin reguladores: “MS-Coco” (MS + 20 ml•L⁻¹ de agua de coco comercial “A de coco®”), “MS-caseína” (MS + 80 mg•L⁻¹ de caseína hidrolizada “MERCK”) y “MS-malta” (MS + 80 mg•L⁻¹ de extracto de malta “Difco™”).

Se estableció un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial desbalanceado, con nueve tratamientos (Cuadro 1), producto de la combinación de tres métodos de desinfestación, y tres tipos de explantes, con dos repeticiones para los explantes tipo I y con cuatro repeticiones los explantes II y III.

Cuadro 1: Lista de tratamientos

Tratamientos	Método de desinfestación	Tipo de Explante
T1	1 (3xNaClO)	I (ápice)
T2	1	II (disco)
T3	1	III (medio disco)
T4	2 (NaClO+Fungicda)	I
T5	2	II
T6	2	III
T7	3 (NaClO+Fungicda+Bactrim)	I
T8	3	II
T9	3	III

Variables respuesta evaluadas

Se realizó una primera evaluación a los 3 días después de la siembra (dds) y la segunda a los 7 dds, luego se realizaron evaluaciones cada 7 días (14 dds, 21 dds, etc.), las variables a evaluar fueron:

- 1) **Desinfestación del explante**, contando los explantes limpios (1) y contaminados (0) por hongos o bacterias
- 2) **Limpieza de explante**, tomando como limpia, el área no necrosada del explante (necrosamiento: cambio de coloración del explante a un tono café oscuro a necrótico), con relación al porcentaje del área visible superior del explante en porcentajes de 5 % (5 %, 10 %, 15 %, ..., 100 %).
- 3) **Respuesta morfogénica**, tomando como explantes respuesta morfogénica (sí: 1, no: 0) a los que presentaron aumento de volumen, deformación o inicio de formación de callo, presencia de PLBs (protocorm-like bodies).

Para el caso de las variables respuesta 1) y 3), los valores obtenidos son binarios. Para este tipo de valores, la literatura sugiere una regresión logística. Sin embargo, solo se analizó estadísticamente la variable 1), ya que las variables 2 y 3 se vieron afectadas por la contaminación de los explantes, lo que impidió un correcto análisis de los datos.

Los datos de la variable 1) fueron transformados usando la ecuación " $\sqrt{x+1}$ ", para obtener una aproximación a una distribución normal, para ello se empleó la formula siendo x el valor observado (Ribeiro, Santana, Pereira & Santos, 2018; Reyes-Castañeda, 2017). Los análisis de varianza y comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$) se llevaron a cabo mediante el software estadístico R v.4.0.3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfestación de explantes

La desinfestación de los tejidos, fue muy limitada, ya que en los resultados encontrados ningún método fue satisfactorio. La presencia de organismos contaminantes se observó, a partir del tercer día, inicialmente con bacterias (26.7 % de los explantes), y a los 7 días se incrementó la contaminación hasta un 60 %, presentándose ahora también, hongos en un 13.3 %, esto fue en aumento hasta alcanzar un 90 % de explantes contaminados a los 35 días, principalmente por bacterias (56.7 %) y en menor medida, hongos (33.3 %), lo cual se mantuvo hasta los 150 dds.

Ante esta situación, se procedió a aplicar tratamientos de rescate al material, desde la primera evaluación (3 dds):

- Primero se pasó el material por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30 % diluido al 6 % con agua destilada esterilizada (10 min).
- Enseguida se pasó a Microdyn® en una dosis de 1 gota por mililitro de agua destilada esterilizada (30 min).
- Después pasó por gentamicina a 100 mg L^{-1} (1 hora)
- Finalmente se pasó por antibiótico Bactrim® 80 mg L^{-1} (30 min) antes de establecerlo en un medio de cultivo nuevo.

Con los procedimientos anteriores, se logró controlar la presencia de organismos contaminantes, sin embargo, este factor fue recurrente, y adicionalmente con el necrosamiento de tejidos, las respuestas fueron muy limitadas.

El análisis de varianza no encontró diferencias significativas en los factores evaluados (Cuadro 2), de modo que no se identificó un método de desinfestación más eficiente para la desinfestación de los explantes, llevando a observar contaminación hasta los 150 dds.

Cuadro 2: Análisis de varianza de desinfestación de los explantes a los 150 dds con fuente de variación (FV), grados de libertad (GL), suma de cuadrados (SC), cuadrados medios (CM), F calculada (Fc) y P-valor.

FV	GL	SC	CM	Fc	P-valor
Desinfestación (Des)	2	0.467	0.233	2.178	0.138 ^{ns}
Explante (Exp)	2	0.383	0.192	1.789	0.192 ^{ns}
Des*Exp	4	0.367	0.092	0.856	0.506 ^{ns}
Error	21	2.250	0.107		
CV	15.6 %				

CV de datos transformados ($\sqrt{X + 1}$). ns: diferencia no significativa.

Autores como Helaly et al. (2014) han declarado que hay patógenos endófitos que pueden interferir con el desarrollo del cultivo de tejidos y competir por los nutrientes, así mismo lo hay algunos que producen fitotoxinas que provocan la mortalidad del cultivo, necrosis tisular y reducen la proliferación de brotes y el enraizamiento.

Los explantes sufrieron en gran medida daños, tanto por la desinfestación empleados, así como por los procesos de rescate, lo que provocó elevadas tasas de necrosamiento (Figura 3), lo cual pudo ocasionar que a los 150 dds solo unos tejidos presentaran respuesta morfogénica. Debido a que se logró una mayor limpieza de los tejidos (T1 y T6).

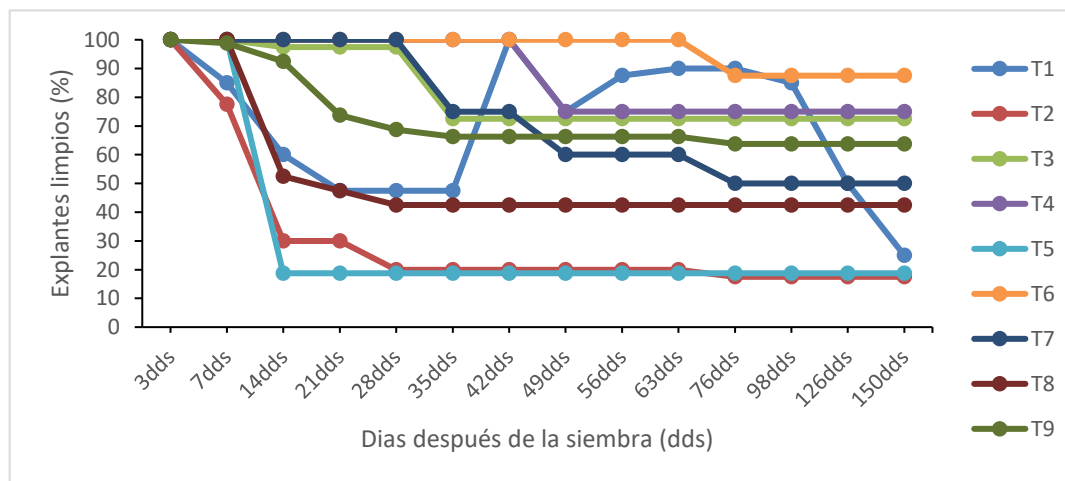


Figura 3: Porcentaje de explantes limpios por tratamientos. Datos promedio a los 150 días.

Respuestas morfogénicas

Los tejidos localizados en el tratamiento 6 (tejidos de disco tipo III, desinfectados por el método NaClO+Fungicida) formaron callo a los 10 días, y aunque se observó un crecimiento de este hasta los 42 días (Figura 4), finalmente no se observó un mayor crecimiento ni diferenciación, sino que finalmente los explantes terminaron necrosándose.

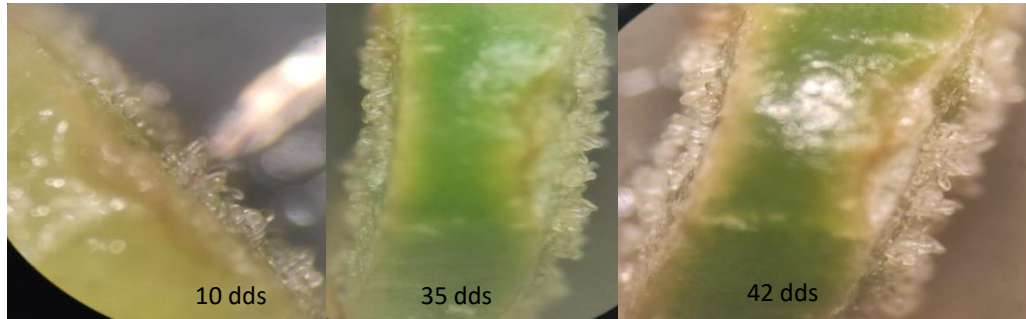


Figura 4: Desarrollo de un explante del tratamiento 6. Formación de callo toral a los 10 dds e incremento de este a los 35 y 42 dds.

Por otro lado, dos explantes ápices del tratamiento 1 (explante tipo I y desinfección por 3xNaClO) se lograron rescatar de contaminación mediante rescates y presentaron crecimiento, e incluso la inducción de primordios foliares, hasta que finalmente terminaron por expresar contaminación y necrosis del tejido (quizás debido, en parte, a los tratamientos de rescate) (Figura 5).

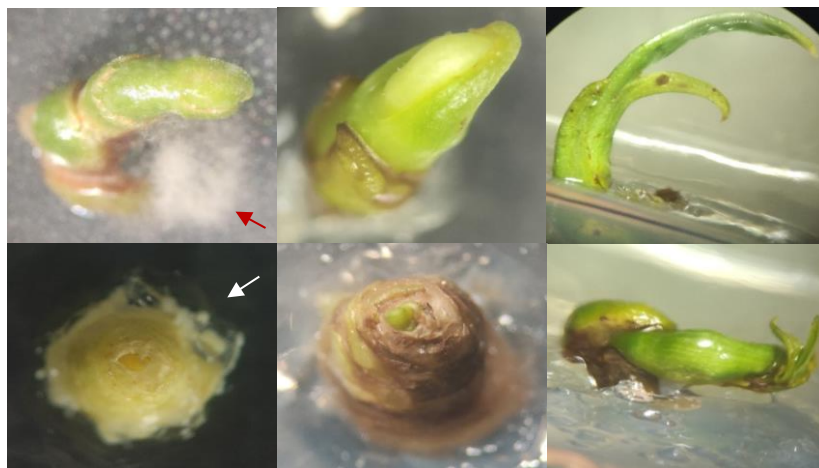


Figura 5: Explantes del tratamiento 1. T1R1 (Tratamiento 1, Repetición 1) en la parte superior izquierda con contaminación de hongo (flecha roja) fue rescatada (parte superior central) y desarrollo hojas (parte superior derecha) y T1R2 (Tratamiento 1, Repetición 2) en la parte inferior izquierda con bacteria (flecha blanca) fue rescatado (centro inferior) y emitió primordios foliares (inferior derecha).

Hay estudios reportan la generación de PLBs en medio MS adicionado con reguladores, como es el caso de Martin (2007), quién logró propagar *Arundina graminifolia* a través de PLBs utilizando nodos como explantes, los cuales cultivaron en medio MS al 50 % con Kinetina 6.97 μM o bien 13.3 μM de BAP. Así mismo, Das, Choudhury & Mazumder (2013) emplearon segmentos nodales para la propagación *in vitro* a través de la proliferación directa de yemas axilares y la multiplicación de brotes, esto sin obtener PLBs.

Debido al elevado índice de contaminación intrínseco del material, y sumado a los altos porcentajes de necrosamiento, no se logró generar nuevos brotes libres de contaminación.

CONCLUSIONES

Cynoches ventricosum presentó niveles muy altos de contaminación con la presencia de organismos como hongos y bacterias, que dificultaron su establecimiento aséptico, en el presente estudio no se logró identificar un tratamiento para solucionar este problema, sin embargo, el tratamiento de rescate podría ser implementado en métodos de desinfestación previo al establecimiento pues ayudó a controlar la contaminación en algunos explantes.

Resulta necesario continuar los estudios para establecer un protocolo de desinfestación eficaz para eliminar la contaminación en pseudobulbos para su establecimiento *in vitro*. Así también es importante evaluar el uso de reguladores en el medio de cultivo para una mejor respuesta.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo del CONACYT mediante la beca y al Laboratorio de Biotecnología del Campo Experimental Rosario Izapa de INIFAP, por facilitar las instalaciones y financiar el estudio.

LITERATURA CITADA

- Arditti, J. (1984). An history of orchid hybridization, seed germination and tissue culture. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 89(4), 359–381. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1984.tb02567.x>
- Coutiño-Cortés., A. G. (2016). Variabilidad genética e inducción callogénica *in vitro* de *Guarianthe skinneri* (Orchidaceae). Tesis Doctoral. El Colegio de la Frontera Sur.
- Das, S., Choudhury, M.D. & Mazumder, P.B. (2013). *In vitro* propagation of *Arundina graminifolia* D. Don.Hochir- A bamboo orchid. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6(5) 156-158
- Gerlach, G. (2013). La pesadilla de Lindley - la biología sexual de *Catasetum* y *Cycnoches*. *Lankesteriana*, 13(1–2), 39–46. <https://doi.org/10.15517/lank.v0i0.11532>
- Helaly, M. N., El-Metwally, M. A., El-Hoseiny, H., Omar, S. A., & El-Sheery, N. I. (2014). Effect of nanoparticles on biological contamination of *in vitro* cultures and organogenic regeneration of banana. *Australian Journal of Crop Science*, 8(4), 612–624.
- Lee-Espinosa, H. E., Murguía-González, J., García-Rosas, B., Córdova-Contreras, A. L., Laguna-Cerda, A., Mijangos-Cortés, J. O., ... Santana-Buzzy, N. (2008). *In vitro* clonal propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* 'Andrews'). *HortScience*, 43(2), 454–458. <https://doi.org/10.21273/hortsci.43.2.454>
- Martin, K. P. (2007). Micropropagation of the bamboo orchid (*Arundina graminifolia* (D. Don) Hochr.) through protocorm-like-bodies using node explants. *Propagation of Ornamental Plants*, 7(2), 97–100.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

- Ribeiro-Oliveira, J. P., Santana, D. G., Pereira, V. J., & Santos, C. M. (2018). Data transformation: An underestimated tool by inappropriate use. *Acta Biometry, Modelling and Statistics*, 40(1), 1-11.
- Reyes-Castañeda, P. (2017). *Bioestadística aplicada: agronomía, biología, química* (2a Ed.) Editorial Trillas. 216 p.
- SEMARNAT. (2010). *Norma Oficial Mexicana. NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección Ambiental-Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestres-Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio-Lista de especies en Riesgo. Diario Oficial de La Federación*, 78.

**RESPUESTAS MORFOGÉNICAS EN TEJIDOS DE RAÍZ CULTIVADOS *IN VITRO*
DE *CYCNOCHES VENTRICOSUM* BATEMAN**

**MORPHOGENIC RESPONSES IN THE *IN VITRO* CULTURE OF ROOT
TISSUES OF *CYCNOCHES VENTRICOSUM* BATEMAN**

RESUMEN

Cycnoches ventricosum pertenece a la familia Orchidaceae, las cuales son plantas muy codiciadas en el mercado ornamental, actualmente debido a su sobrexplotación este grupo de plantas están amenazadas, elevando su nivel de vulnerabilidad, la SEMARNAT en el 2010, reportó más de 180 orquídeas en alguna categoría de elevado riesgo, debido a innumerables factores de afectación de estas especies en sus hábitats naturales, y a su destrucción. Además, muchas de estas orquídeas, presentan problemas asociados a su propagación, debido a las características de sus semillas y por largos periodos de juvenilidad. Así se planteó, establecer un protocolo *in vitro* que permita tanto la obtención, propagación de plantas y así como su posterior conservación. Actualmente el empleo de cultivo *in vitro* dentro de la familia Orchidaceae, se han realizado de manera exitosa diversas especies, pero para *Cycnoches ventricosum*, no se ha reportado algún protocolo de propagación *in vitro*. Se utilizaron como medio básico las sales inorgánicas de Murashige & Skoog (1962) sin reguladores, se exploraron dos métodos de desinfestación, y posteriormente, se cultivaron tejidos de la cofia y velamen con el objetivo de inducir la organogénesis *in vitro* en *C. ventricosum*, encubados en condiciones de luz y oscuridad en medio MS. De los resultados se observó que la ausencia de reguladores del crecimiento y el tipo de explante fueron los factores determinantes, tanto para el control de contaminantes, así como para la inducción de las respuestas morfogénicas, en los tejidos de cofia. Se logró generar PLBs ("protocorm-like bodies") en un explante de cofia a los 35 y en otro a los 49 días

en oscuridad. El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial, analizado mediante el software estadístico R.

Palabras clave: micropropagación, clonal, rescate, explante.

ABSTRACT

Cycnoches ventricosum belongs to the Orchidaceae family, which are highly coveted plants in the ornamental market, currently due to their overexploitation this group of plants are threatened, raising their level of vulnerability, SEMARNAT in 2010, reported more than 180 orchids in some category of high risk, due to innumerable factors affecting these species in their natural habitats, and their destruction. In addition, many of these orchids present problems associated with their propagation, due to the characteristics of their seeds and long periods of youth. Thus, it was proposed to establish an in vitro protocol that allows both the obtaining, propagation of plants and their subsequent conservation. Currently the use of in vitro culture within the Orchidaceae family, various species have been successfully carried out, but for *Cycnoches ventricosum*, no in vitro propagation protocol has been reported. The inorganic salts of Murashige & Skoog (1962) without regulators were used as basic medium, two disinfestation methods were explored, and subsequently, tissues of the cap and canopy were cultured with the aim of inducing organogenesis in vitro in *C. ventricosum*, incubated under light and dark conditions in MS medium. From the results it was observed that the absence of growth regulators and the type of explant were the determining factors, both for the control of contaminants, as well as for the induction of morphogenic responses, in the cap tissues. PLBs ("protocorm-like bodies") were generated in one cap explant at 35 days and in another at 49 days in the dark. The experimental design was completely randomized with a factorial arrangement, analyzed using the statistical software R.

Keywords: micropropagation, clonal, rescue, explant.

INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae es una de las más diversas en el mundo con más de 25 000 especies (Chase et al., 2015). Estas especies presentan graves problemas de propagación, siendo que las semillas de orquídeas carecen de endospermo, por lo que contienen escasos nutrimentos o reservas para realizar la germinación *in vivo* (Flores-Escobar, Legaria-Solano, Gil-Vásquez, & Colinas-León, 2008). Por lo tanto, en condiciones naturales se asocian con hongos micorrízicos que permiten que la planta se desarrolle. Esto sumado a un largo periodo juvenil y al hecho de que son conocidas por su uso ornamental; estas se consideran un grupo amenazado, pues a pesar de que en el país la colecta y venta de orquídeas silvestres está prohibida, su extracción para venta es uno de los mayores problemas. En la NOM-059-SEMARNAT (2010). Se reportan 188 orquídeas que se encuentran en un grado de peligro entre ellas *C. ventricosum*, entrando en la categoría de amenazada.

El cultivo *in vitro* es una herramienta de biotecnología vegetal que engloba un conjunto de técnicas mediante las cuales se pueden obtener células, tejidos o plantas completas libres de patógenos en un menor tiempo comparado con la propagación tradicional (Cardoza, 2008). Por lo tanto, mediante el uso de estas técnicas se puede micropropagar clonal fácilmente individuos élite de especies de interés, conservar especies en peligro de extinción, y obtener metabolitos secundarios; entre otras aplicaciones (Hussain, Qarshi, Nazir & Ullah, 2012).

Actualmente se han reportado casos de regeneración de yemas en los ápices de las raíces de algunas especies de orquídeas tanto en condiciones naturales como *in vitro*, aunque la capacidad de las raíces de las orquídeas para formar brotes es baja (Kerbaui, 1984). Tal es el caso de Churchill et al. (1973) que intentaron inducir la formación de brotes *in vitro* utilizando raíces en *Epidendrum o'brienianum* y aunque las raíces permanecieron vivas *in vitro* durante largos periodos, no se formaron brotes ni PLBs (protocorm-like bodies), sin embargo, Stewart & Button (1978) trabajaron con la misma planta tuvieron éxito en la obtención de callos, pero solo una planta se regeneró de callos de raíces.

Kerbaudy (1984) estudió el potencial de un híbrido de *Catasetum* de las puntas de las raíces y encontró que el uso de ácido naftalenoacético (ANA) en el medio condujo a la inducción de callos, por otro lado, la incorporación de una combinación de agua de coco, peptona y tiamina resultó en la regeneración directa de PLB en el 54 % de los cultivos, contrariamente, la presencia de auxina exógena en los medios redujo drásticamente el número de PLBs formados, pero aumentó la formación de callo. Los segmentos cultivados de la capacidad de la punta de la raíz de orquídeas para formar directamente PLB representa un ejemplo auténtico de conversión directa de un ápice de raíz en una yema, por tanto, en las raíces aéreas puede existir un cierto grado de plasticidad en la determinación de órganos (Chugh et al., 2009).

En este trabajo se establecieron explantes de cofia y velamen con el objetivo de lograr una propagación clonal *in vitro* en *C. ventricosum* mediante dos métodos de desinfestación, encubados en condiciones de luz y oscuridad en medio MS.

METODOLOGÍA

Material Biológico

Plantas madre se colectaron de la reserva ecológica de “El Triunfo”, Santa Rita de las Flores, Mapastepec, Chiapas. Estas fueron llevadas al Laboratorio de Biotecnología del Campo Experimental Rosario Izapa (CERI), del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en Tuxtla Chico, Chiapas, en donde se obtuvieron las primeras respuestas morfogénicas. Las actividades se realizaron en el periodo de 15 de febrero al 16 de agosto del 2021.

Los explantes, luego, fueron trasladados al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), con dirección en Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, México. C.P. 56230, en donde se le dio seguimiento.

Raíces jóvenes con crecimiento activo fueron cortadas y se obtuvieron las cofias, las cuales, se sometieron a dos métodos de desinfestación.

- **Método 1:** Las raíces se sumergieron en alcohol al 70 % por 30 s, seguido de tres enjuagues con agua destilada esterilizada, después de esto se aplicaron tres desinfestaciones consecutivas con NaClO (Cloralex®) a diferentes concentraciones y tiempos (min), en una adaptación a lo que hicieron Lee-Espinosa et al. (2008):
 - 1: Las raíces se sometieron a NaClO al 10 % (v/v) por 20 min
 - 2: Se pasa a NaClO al 5 % por 10 min
 - 3: Inmersión final en NaClO al 2 % por 2 min.
- **Método 2:** las raíces se sometieron a una solución fungicida de Promyl®-Agrygent plus® ($1\text{g}\bullet\text{L}^{-1}$ c/u) en un agitador orbital a 110 rpm por 1 h, luego de esto, las raíces se sumergieron en una solución de alcohol al 70 % por 30 s y se le aplicaron tres enjuagues con agua destilada esterilizada, enseguida se sumergieron en NaClO al 0.6 % por 10 min de acuerdo con Coutiño-Cortés (2016).

Las raíces desinfectadas se cortaron para obtener dos tipos de explante.

- **Cofia:** tejido terminal de la raíz (explantes de 1-2 mm de longitud)
- **Velamen:** discos del tejido de raíz sin cofia (explantes de 3-5 mm)

Los explantes de cofia se establecieron de forma individual, mientras que los discos de velamen se establecieron en grupos de cinco explantes en una caja Petri. El medio consistió en sales MS, sin reguladores en ambos explantes. Finalmente, los explantes se incubaron de dos condiciones de incubación.

- **Luz:** una parte se guardará en condiciones de luz
- **Oscuridad:** la parte restante se guardará en una caja para simular condiciones de oscuridad.

Los explantes viables se subcultivaron cada 24 días, distribuidos en tres medios de cultivo sin reguladores: “MS-Coco” (MS + 20 ml•L⁻¹ de agua de coco comercial “A de coco®”), “MS-caseína” (MS + 80 mg•L⁻¹ de caseína hidrolizada “MERCK”) y “MS-malta” (MS + 80. mg•L⁻¹ de extracto de malta “Difco™”) y “MS-malta” (MS + 80. mg•L⁻¹ de extracto de malta).

Se estableció un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial con ocho tratamientos (Cuadro 3), producto de la combinación de dos tipos de explante, dos métodos de desinfestación, y dos condiciones de incubación, con cuatro repeticiones de cofia y 20 de velamen.

Cuadro 3: Lista de tratamientos

Tratamientos	Método de desinfestación	Tipo de Explante	Incubación
1	1 (3xNaClO)	1 (cofia)	1 (luz)
2	1	1	2 (oscuridad)
3	1	2 (velamen)	1
4	1	2	2
5	2 (NaClO+Fungicda)	1	1
6	2	1	2
7	2	2	1
8	2	2	2

Variables respuesta evaluadas

1) **Desinfestación del explante**, contando los explantes limpios (1) y contaminados (0) por hongos o bacterias

2) **Limpieza de explante**, tomando como limpia, el área no necrosada del explante (necrosamiento: cambio de coloración del explante a un tono café oscuro a necrótico), con relación al porcentaje del área visible superior del explante en porcentajes de 5 % (5 %, 10 %, 15 %, ..., 100 %).

3) **Respuesta morfogénica**, tomando como explantes respuesta morfogénica (sí: 1, no: 0) a los que presentaron aumento de volumen o formación de callo

Para el caso de las variables respuesta 1) y 3), los valores obtenidos son binarios. Para este tipo de valores, la literatura sugiere una regresión logística. La variable respuesta 2) fue analizada mediante un ANOVA clásico, con $\alpha=0.05$.

Los datos fueron transformados usando la ecuación " $\sqrt{x+1}$ ", para obtener una aproximación a una distribución normal, siendo x el valor observado (Ribeiro, Santana, Pereira & Santos, 2018; Reyes-Castañeda, 2017). Los análisis de varianza y comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$) se llevaron a cabo mediante el software estadístico R v.4.0.3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfestación del explante

La contaminación en los explantes se presentó a partir del tercer día (Figura 6), principalmente hongos (71 %) y en menor medida, bacterias (29 %), lo cual, solo ocurrió en los explantes de velamen, afectando al 15 % de los explantes totales. Esto continuó en acenso hasta los 28 días (4 días después del primer subcultivo), donde se observó la mayor contaminación, llegando a afectar al 53% de los explantes debido a hongos (73 %) y bacterias (23 %).

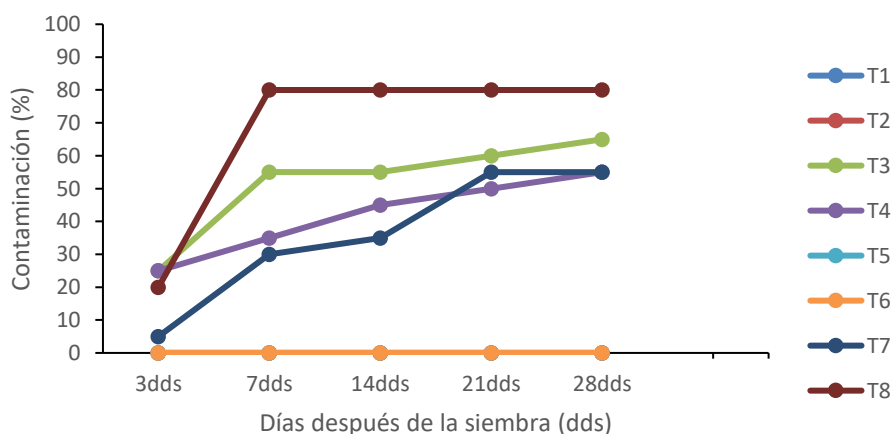


Figura 6: Porcentaje de contaminación en los tratamientos. Datos promedio a los 35 días después de la siembra.

El análisis de varianza mostró un efecto importante por parte del explante (Cuadro 4).

Cuadro 4: Análisis de varianza de desinfestación de los explantes a los 28 dds con fuente de variación (FV), grados de libertad (GL), suma de cuadrados (SC), cuadrados medios (CM), F calculada (Fc) y P-valor.

FV	GL	SC	CM	Fc	P-valor
Desinfestación (Des)	1	0.260	0.260	1.291	0.259 ^{ns}
Explante (Exp)	1	5.419	5.419	26.865	1.3E-6 ^{**}
Condición (Cond)	1	0.094	0.094	0.465	0.497 ^{ns}
Des*Exp	1	0.052	0.052	0.258	0.613 ^{ns}
Des*Cond	1	0.260	0.260	1.291	0.259 ^{ns}
Exp*Cond	1	0.019	0.019	0.093	0.761 ^{ns}
Des*Exp*Cond	1	0.052	0.052	0.258	0.613 ^{ns}
Error	88	17.750	0.202		
CV	15.6 %				

^{**}Diferencia altamente significativa, con $\alpha=0.01$, ns= diferencia no significativa. CV de datos transformados ($\sqrt{X + 1}$).

El total (100 %) de los explantes de cofia respondieron positivamente a los métodos de desinfestación, mientras que los explantes de velamen solo un 36 % de los explantes fueron correctamente desinfestados (Cuadro 5).

Cuadro 5: Comparación de medias para desinfestación de explantes entre niveles del factor explante a los 28 dds.

Explante	Media
Cofia	1.000 a [†]
Velamen	0.363 b

[†] Letras distintas son significativamente diferentes (Tukey ≤ 0.05).

Limpieza de explante

Los resultados demostrados en el análisis de varianza (Cuadro 6) mostraron que tanto el tipo de desinfestación y el tipo de explante tuvieron efecto la limpieza de los explantes.

Cuadro 6. Análisis de varianza de limpieza de explante a 28 dds con fuente de variación (FV), grados de libertad (GL), suma de cuadrados (SC), cuadrados medios (CM), F calculada (Fc) y P-valor.

FV	GL	SC	CM	Fc	P-valor
Desinfestación (Des)	1	0.658	0.658	4.766	0.032 *
Explante (Exp)	1	0.888	0.888	6.432	0.013 *
Condición (Cond)	1	0.433	0.433	3.137	0.080 ^{ns}
Des*Exp	1	0.174	0.174	1.263	0.264 ^{ns}
Des*Cond	1	0.068	0.068	0.490	0.486 ^{ns}
Exp*Cond	1	0.236	0.236	1.711	0.194 ^{ns}
Des*Exp*Cond	1	0.021	0.021	0.150	0.700 ^{ns}
Error	88	12.155	12.155		
CV	11.6 %				

CV de datos transformados ($\sqrt{X + 1}$). *Diferencia significativa, con $\alpha=0.05$, ns: diferencia no significativa.

Los explantes sometidos al método de desinfestación NaClO+Fungicida mostraron mayor limpieza (81 %), en comparación del 3X NaClO (63 %), los cuales presentaron un mayor necrosamiento (Cuadro 7).

Cuadro 7. Comparación de medias de limpieza de explante entre los métodos de desinfestación a los 35 dds.

Desinfestación	Media
NaClO+Fungicida	0.81 a [†]
3XNaClO	0.63 b

[†] Letras distintas son significativamente diferentes (Tukey ≤ 0.05).

Las cofias permanecieron limpias casi totalmente (94 %), mientras que los explantes de velamen presentaron un necrosamiento superior al 50 % (Cuadro 8).

Cuadro 8. Comparación de medias de limpieza de explante entre los niveles del factor explante a los 35 dds.

Explante	Media
Cofia	0.94 a [†]
Velamen	0.68 b

† Letras distintas son significativamente diferentes (Tukey ≤ 0.05).

El necrosamiento de tejidos, es debido probablemente a los métodos de desinfestación o a los agentes y concentraciones empleados, ya que en ocasiones estos acentúan el problema del necrosamiento (Azofeifa, 2009). Seneviratne & Wijesekara (1996), evaluaron diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) y cloruro de mercurio (HgCl₂) para la desinfestación de brotes de *Hevea brasiliensis* y encontraron que la desinfestación de los explantes con NaClO promovió más el necrosamiento de tejidos y la exudación de fenoles. Por lo que el necrosamiento puede disminuir con la sustitución del agente desinfectante o la reducción de la concentración y al tiempo expuesto a este.

Respuesta morfológica

El análisis de varianza (Cuadro 9) mostró el tipo de explante influyó en la respuesta morfológica.

Cuadro 9. ANOVA para respuesta morfológica a los 35 dds con fuente de variación (FV), grados de libertad (GL), suma de cuadrados (SC), cuadrados medios (CM), F calculada (Fc) y P-valor.

FV	GL	SC	CM	Fc	P-valor
Desinfestación (Des)	1	0.010	0.010	0.965	0.329 ^{ns}
Explante (Exp)	1	13.00	13.002	1204.404	2E-16 ^{**}
Condición (Cond)	1	0.010	0.010	0.965	0.329 ^{ns}
Des*Exp	1	0.002	0.002	0.193	0.662 ^{ns}
Des*Cond	1	0.010	0.010	0.965	0.329 ^{ns}
Exp*Cond	1	0.002	0.002	0.193	0.662 ^{ns}
Des*Exp*Cond	1	0.002	0.002	0.193	0.662 ^{ns}
Error	88	0.950	0.011		

CV	4.01 %
-----------	--------

CV de datos transformados ($\sqrt{X + 1}$). **Diferencia altamente significativa, con $\alpha=0.01$, ns: diferencia no significativa.

Si bien desde los 7 dds todas las cofias presentaron crecimiento como respuesta morfogénica (Cuadro 10), fue hasta los 35 dds (después del primer subcultivo a los 24 dds, en medio MS-Coco) que se observó crecimiento en un explante de velamen (el cuál terminó por necrosarse totalmente).

Cuadro 10. Comparación de medias de la respuesta morfogénica entre los niveles del factor explante a los 35 dds.

Explante	Media
Cofia	1.000 a [†]
Velamen	0.013 b

† Letras distintas son significativamente diferentes (Tukey ≤ 0.05).

Es importante señalar que, aparte del tipo de regulador del crecimiento, la edad fisiológica de los tejidos afecta la formación de brotes y PLB en los segmentos de las raíces. En un estudio, Vij, Aggarwal & Pathak (2004), reportan que las raíces jóvenes de cultivos axénicos de híbridos de la orquídea *Cymbidium* se regeneraron en ciertas composiciones de medios, pero los segmentos de raíces más viejas no respondieron. A pesar de la capacidad morfogenética limitada del meristemo de la raíz de las plantas superiores, incluidas las orquídeas, la utilidad de los explantes de raíces para fines de micropropagación se está reconociendo cada vez más debido a su disponibilidad durante todo el año, su baja tasa de oxidación y la facilidad con la que se pueden explantar (Chugh et al., 2009). Por otro lado, el resto del tejido de la raíz que carece de meristemas (explantes de velamen) no posee este gran potencial, aunque algunos explantes puedan presentar respuestas morfogénicas que podría deberse a la presencia de las pocas células meristemáticas que aún conserva.

En el presente trabajo no se observó la presencia de callo, sino que directamente el explante aumentó su tamaño, después de lo cual emergieron los PLBs en el tratamiento 2 (T2: desinfestación por 3xNaClO, explantes de cofia y oscuridad) a

los 35 dds (Figura 7) en la repetición 2 (R2) y a los 49 dds la repetición 4 (R4), este último empezó a emitir raíces a los 91dds (Figura 8).

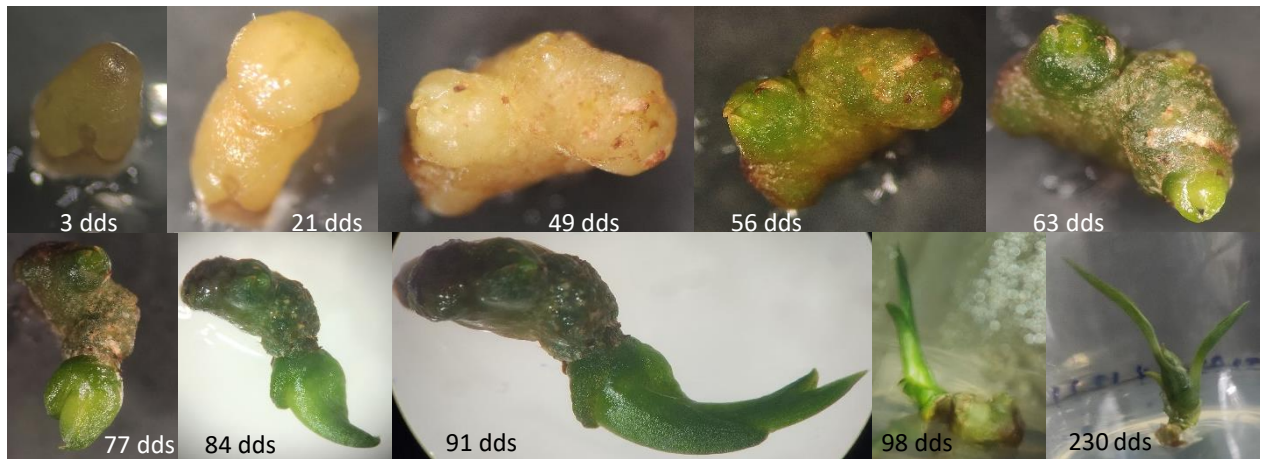


Figura 7: Respuesta morfológica de repetición 2 del tratamiento 2 (T2R2). Condición inicial a los 3 dds y desarrollo a lo largo de las evaluaciones, hasta la obtención de un brote con primordios foliares extendidos (230 dds).

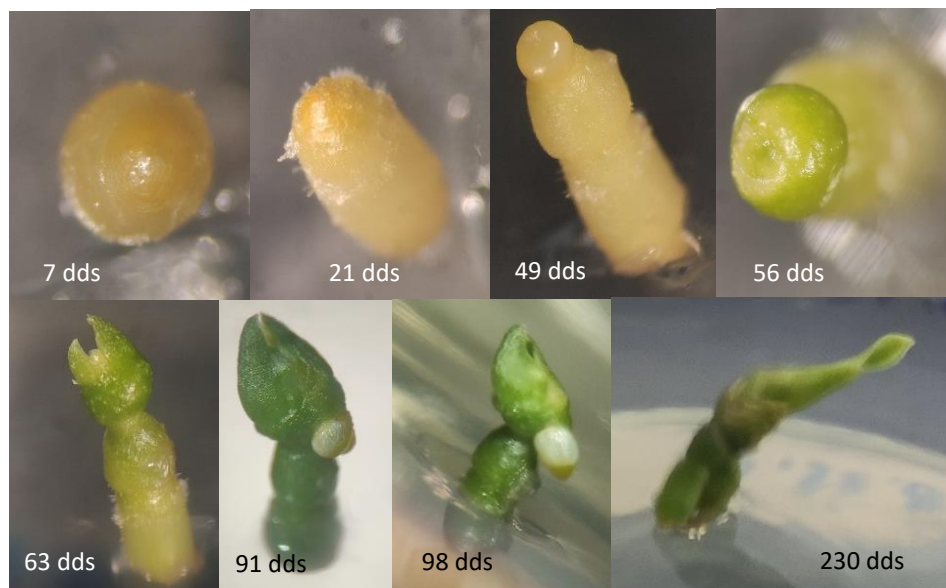


Figura 8: Respuesta morfológica de repetición 4 del tratamiento 2 (T2R4). Condición inicial a los 7 dds y desarrollo a lo largo de las evaluaciones, hasta la obtención de un brote con primordios foliares (230 dds).

Kraus & Monteiro (1989) explicaron que la formación de brotes a partir de las células de las raíces meristemáticas se caracteriza por un aumento de la actividad mitótica que no implica necesariamente una etapa de calo como en la mayoría de las otras especies de orquídeas estudiadas.

Mehraj, Alam, Habiba & Mehbub (2019) explicaron que la ausencia de luz juega un papel importante en la inducción de PLB, así como la luz influye en la diferenciación de PLB en plántulas, e incluso el tipo de luz utilizada puede influenciar para optimizar la regeneración de las PLB, con el uso de LED rojo y blanco combinado con sacarosa como fuente de carbohidratos, o LED azul y blanco con trehalosa como fuente de carbohidratos, que tuvo la mejor respuesta para la regeneración de PLBs, por otro lado, ellos reportan que solo un bajo porcentaje de trabajos emplean un período de oscuridad para inducir PLBs. En el presente estudio el único tratamiento que presentó PLBs pasó un periodo inicial en condiciones de oscuridad.

CONCLUSIONES

Después de 230 días de la siembra, el único tratamiento que generó PLBs y subsecuentemente brotes, fue el T2, el cual consiste en tejidos de cofias incubadas en oscuridad.

El tipo de explante fue el factor más importante, siendo las cofias los explantes más ideales para el cultivo *in vitro*, pues la presencia de organismos contaminantes fue nula en cualquier método de desinfestación, hasta el primer subcultivo (24 días) y presentaron respuestas morfogénicas, sin embargo, fue escasa en los tejidos para emitir PLBs que formaron brotes, aunque con un crecimiento muy lento.

El necrosamiento de los explantes también inhibió las respuestas morfogénicas de los tejidos de velamen, ya que estos fueron los que más presentaron problemas de necrosamiento y ningún otro explante presentó PLBs. El método de desinfestación con utilizando, tres dosis de NaClO (3XNaClO) causó mayor daño en lo explantes, provocando su necrosamiento.

La respuesta morfogénica por parte de las cofias fue principalmente de crecimiento de brotes y solo dos explantes generaron PLBs y brotes, mientras que el resto de explantes detuvo su crecimiento por necrosarse, por lo que es

importante experimentar el uso de otros reguladores de crecimiento y con otras concentraciones, ya que la presencia de reguladores en forma endófito en algunos explantes, quizás, no fue suficiente para promover la diferenciación celular para promover la formación de PLBs.

LITERATURA CITADA

Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153-175.

Cardoza, V. (2008). Tissue culture: The manipulation of plant development. In Neal, C. & Stewart, Jr. (Eds.). *Plant biotechnology and genetics: Principles, techniques and applications*. (pp 113-132).

Chase, M. W., Cameron, K. M., Freudenstein, J. V., Pridgeon, A. M., Salazar, G., van den Berg, C., & Schuiteman, A. (2015). An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 177(2), 151–174. <https://doi.org/10.1111/boj.12234>

Chugh, S., Guha, S., & Rao, I. U. (2009). Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*, 122(4), 507-520.

Churchill, M. E., Ball, E. A., & Arditti, J. (1973). Tissue culture of orchids I. Methods for leaf tips. *New Phytologist*, 72(1), 161-166.

Coutiño-Cortés., A. G. (2016). Variabilidad genética e inducción callogénica *in vitro* de *Guarianthe skinneri* (Orchidaceae). Tesis Doctoral. El Colegio de la Frontera Sur.

Flores-Escobar, G., Legaria-Solano, J. P., Gil-Vásquez, I., & Colinas-León, M. T. (2008). Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl., una orquídea amenazada y endémica de México. *Revista Chapingo Serie*

- Hussain, A., Qarshi, I. A., Nazir, H., & Ullah, I. (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. In A. Leva, & L. M. R. Rinaldi (Eds.), Recent Advances in Plant *in vitro* Culture. *IntechOpen*.
<https://doi.org/10.5772/50568>
- Kerbaudy, G. B. (1984). *In vitro* flowering of *Oncidium varicosum* mericlones (Orchidaceae). *Plant Science Letters*, 35(1), 73-75.
- Kraus, J.E., Monteiro, W.R., 1989. Formation of protocorm-like bodies from root apices of *Catasetum pileatum* (Orchidaceae) cultivated *in vitro*. I. Morphological aspect. *Annals of Botany*, 64(5), 491-498.
- Lee-Espinosa, H. E., Murguía-González, J., García-Rosas, B., Córdova-Contreras, A. L., Laguna-Cerda, A., Mijangos-Cortés, J. O., ... Santana-Buzzy, N. (2008). *In vitro* clonal propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* 'Andrews'). *HortScience*, 43(2), 454–458.
<https://doi.org/10.21273/hortsci.43.2.454>
- Mehraj, H., Alam, M., Habiba, S. U., & Mehbub, H. (2019). LEDs combined with CHO sources and CCC priming PLB regeneration of *Phalaenopsis*. *Horticultrae*, 5(2), 34.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nikishina, T. V., Popov, A. S., Kolomeitseva, G. L., and Golovkin, B. N. (2001). Cryopreservation of seeds of some tropical orchids. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 378, 231–233.
- Reyes-Castañeda, P. (2017). Bioestadística aplicada: agronomía, biología, química (2a Ed.) Editorial Trillas. 216 pp.

- Ribeiro-Oliveira, J. P., Santana, D. G. de, Pereira, V. J., & Santos, C. M. (2018). Data transformation: An underestimated tool by inappropriate use. *Biometry, Modelling and Statistics*, 40(1), 1–11.
- SEMARNAT. (2010). *Norma Oficial Mexicana. NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección Ambiental-Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestres-Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio-Lista de especies en Riesgo. Diario Oficial de La Federación*, 78.
- Seneviratne, P., & Wijesekara, G. A. S. (1996). The problem of phenolic exudates in *in vitro* cultures of mature *Hevea brasiliensis*. *Journal of Plantation Crops*, 24, 54-62.
- Stewart, & J. Button J. (1978). Development of callus and plantlets from *Epidendrum* root tips cultured *in vitro*, *American Orchid Society Bulletin*, 47(7), 607-612.
- Vij, S. P., Aggarwal, S., & Pathak, P. (2004). Regeneration competence of *Cymbidium* Great Waltz× Valey flower roots: a study *in vitro*. *Journal of the Orchid Society of India*, 18, 109-115.

**RESPUESTAS MORFOGÉNICAS A PARTIR DEL CULTIVO *IN VITRO* DE
SEGMENTOS FOLIARES DE *Cycnoches ventricosum* BATEMAN**

**MORPHOGENIC RESPONSES FROM *IN VITRO* CULTURE OF FOLIAR
SEGMENTS OF *Cycnoches ventricosum* BATEMAN**

RESUMEN

La familia Orchidaceae, es considerada dentro del reino vegetal como una de las más grandes, y son especies muy llamativas, por lo que son muy apreciadas en el mercado ornamental, actualmente es un grupo muy vulnerable por una sobre explotación y alteración de sus nichos ecológicos en todo el mundo, lo que las sitúa como un grupo de especies muy amenazado. *Cycnoches ventricosum*, al igual que otras especies de esta familia, se ubica dentro de la categoría de especies amenazadas, de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT (2010). Esta especie, debido a la destrucción y alteración de su hábitat natural y por presentar problemas biológicos asociados a su propagación presenta enormes riesgos de sobrevivencia. Por lo que se planteó utilizar la técnica del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales como estrategia para recuperar plantas a través de un protocolo de propagación, que asegure su posterior conservación. Empleando como medio básico, las sales inorgánicas MS de Murashige & Skoog (1962), suplementado con sacarosa ($30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) para evaluar los factores que permitan su propagación a partir del cultivo *in vitro* de segmentos de hojas, inicialmente se emplearon diferentes métodos de desinfección de tejidos, sembrados posteriormente en tres medios de cultivo, uno sin reguladores, otro suplementado con 2,4-D ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) y BAP ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) y finalmente otro con TDZ ($3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), los explantes se sembraron en dos posiciones de siembra (acostado y enterrado). Encontrando que la contaminación intrínseca del material fue muy alta en las hojas, esto sumado al necrosamiento de los explantes, impidió la formación de callo y PLBs

(protocorm-like bodies). El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial, analizado mediante el software estadístico R.

Palabras clave: micropropagación, orquídea, rescate, explante.

ABSTRACT

The Orchidaceae family is considered within the plant kingdom as one of the largest, and they are very striking species, which is why they are highly appreciated in the ornamental market, currently it is a very vulnerable group due to over-exploitation and alteration of its ecological niches. throughout the world, which places them as a highly threatened group of species. *Cynoches ventricosum*, like other species of this family, is located within the category of threatened species, according to NOM-059-SEMARNAT (2010). This species, due to the destruction and alteration of its natural habitat and for presenting biological problems associated with its propagation, presents enormous risks of survival. Therefore, it was proposed to use the in vitro culture technique of plant tissues as a strategy to recover plants through a propagation protocol, which ensures their subsequent conservation. Using the MS inorganic salts of Murashige & Skoog (1962) as a basic medium, supplemented with sucrose (30 g•L⁻¹) to evaluate the factors that allow its propagation from the in vitro culture of leaf segments, initially different methods of tissue disinfestation, subsequently planted in three culture media, one without regulators, another supplemented with 2,4-D (1.0 mg•L⁻¹) and BAP (0.5 mg•L⁻¹) and finally another with TDZ (3.0 mg•L⁻¹), the explants were planted in two planting positions (lying down and buried). Finding that the intrinsic contamination of the material was very high in the leaves, this added to the necrosis of the explants, prevented the formation of callus and PLBs (protocorm-like bodies). Completely randomized experimental designs with factorial arrangement were used and data were analyzed with the statistical software R.

Keywords: micropropagation, orchid, rescue, explant.

INTRODUCCIÓN

La orquídea *Cycnoches ventricosum* padece serios problemas de propagación siendo que además de presentar un periodo juvenil largo y ausencia de endospermo en las semillas, presenta una condición denominada “sportive condition”, que significa que produce flores masculinas y femeninas en períodos diferentes (Gerlach, 2013) por lo que su reproducción sexual se ve aún más complicada por esto y debido tanto al saqueo, como a la destrucción de áreas naturales, esta especie como muchas otras, ha sido catalogada como una especie en peligro por la SEMARNAT (2010), cayendo en la categoría de amenazada. De modo que es importante generar opciones de conservación y propagación de estas especies, para lo cual se ha empleado muy frecuentemente la técnica de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, ya que nos permite multiplicar plantas a partir de casi cualquier segmento de la misma.

A diferencia de otros tejidos, los explantes foliares son fáciles de obtener y no requieren el sacrificio de la planta madre, además su disponibilidad es mayor a las semillas. Wimber en 1965, fue pionero en el cultivo de tejidos foliares y presentó el primer informe bien documentado sobre la producción de PLB a partir de hojas de *Cymbidium* (Téllez-Velasco, 2011). Churchill et al. (1973) intentaron cultivar secciones de la mayoría de las partes de la hoja (puntas, pecíolos, varias secciones del limbo y la base) de *Laeliocattleya portia* 'Mayflower' y *Epidendrum o'brienianum*, encontrando que solo las puntas de las hojas formaron callos y PLBs. Por otro lado, Mathews & Rao (1985) reportaron que la base de las hojas de vanda fue la región más susceptible para el crecimiento con más del 80 % de los cultivos. Mitra, Prasad & Roychowdhury (1976) indicaron que las hojas más jóvenes tienen más probabilidades de formar más PLB y brotes. Chen, Chang & Chang (1999) informaron sobre la embriogénesis somática directa a partir de hojas jóvenes de *Oncidium* 'Gower Ramsey' tan pronto como 20 días después del cultivo utilizando medio MS de concentración media suplementado con 0.3 a 3 mg•L⁻¹ de TDZ. La apariencia inicial de los embriones foliares parece estar afectada por la etapa de madurez de las hojas, sin embargo, las hojas más viejas

dieron un mejor resultado. Entre los reguladores, le ha encontrado que TDZ promueve la embriogénesis somática directa de las células epidérmicas y la embriogénesis somática secundaria de explantes de hojas de *Phalaenopsis amabilis* (Chen & Chang, 2006).

En el presente estudio se evaluó el establecimiento aséptico de explantes foliares mediante tres métodos de desinfestación, en tres medios de cultivo MS sin y con reguladores y dos posiciones de siembra del explante.

METODOLOGÍA

Plantas madre se colectaron de la reserva ecológica de “El Triunfo”, Santa Rita de las Flores, Mapastepec, Chiapas. Estas fueron llevadas al Laboratorio de Biotecnología del Campo Experimental Rosario Izapa (CERI), del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícola y Pecuarias (INIFAP) en Tuxtla Chico, Chiapas, en donde se obtuvieron las primeras respuestas morfogénicas. Las actividades se realizaron en el periodo de 15 de febrero al 16 de agosto del 2021.

Los explantes, luego, fueron trasladados al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), con dirección en Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, México. C.P. 56230, en donde se le dio seguimiento.

Hojas jóvenes sin daños, se sometieron a diferentes métodos de desinfestación.

- **Método 1:** las hojas se sumergieron en una solución de alcohol al 70 % por 30 s y se le aplicaron tres enjuagues con agua destilada esterilizada, luego pasaron a una desinfestación con NaClO al 0.6 % por 10 min de acuerdo con Coutiño-Cortés (2016)
- **Método 2:** Las hojas se sumergieron en alcohol al 70 % por 30 s, seguido de tres enjuagues con agua destilada esterilizada, después de esto se aplicaron tres desinfestaciones consecutivas con NaClO a

diferentes concentraciones (%) v/v y tiempos (min) en una adaptación a lo que hicieron Lee-Espinosa et al. (2008):

- 1: primero las hojas se sometieron a NaClO al 10 % v/v por 20 min
- 2: Se pasa a NaClO al 5 % por 10 min
- 3: Inmersión final en NaClO al 2 % por 2 min.

- **Método 3:** las hojas se sometieron a una solución fungicida de Promyl®-Agrygent plus® ($1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ c/u) en agitador orbital a 110 rpm por 1 h, luego de esto, las hojas se sumergieron en una solución de alcohol al 70 % por 30 s y se les aplicó tres enjuagues con agua destilada esterilizada, seguida de una desinfección con NaClO al 0.6 % por 10 min

Una vez desinfectadas las hojas, se obtuvieron segmentos de $5\text{ mm} \times 5\text{ mm}$ (25 mm^2), los cuales se establecieron en dos posiciones de siembra.

Acostado: Horizontal al medio, explante acostado en posición invertida (con el haz hacia abajo)

- Enterrado: Vertical, enterrando a la mitad del explante en el medio de cultivo



Los explantes se sembraron en tres medios de cultivo:

- **MS:** sales MS (Anexo 1) sin reguladores
- **MS+1.0 mg L⁻¹ de 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ de BAP.**
- **MS+3.0 mg L⁻¹ de TDZ.**

Los explantes viables se subcultivaron cada 24 días, distribuidos en tres medios de cultivo sin reguladores: “MS-Coco” (MS + $20\text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$ de agua de coco comercial “A de coco®”), “MS-caseína” (MS + $80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de caseína hidrolizada “MERCK”) y “MS-malta” (MS + $80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de extracto de malta “Difco™”) y “MS-malta” (MS + $80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de extracto de malta).

Se estableció un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial con 18 tratamientos (Cuadro 11), producto de la combinación de dos posiciones de explante, tres métodos de desinfestación, y tres medios de cultivo, con 10 repeticiones cada uno.

Cuadro 11: Lista de tratamientos

Tratamientos	Desinfestación	Siembra	Medio de cultivo
1	1 (NaClO)	1 (acostado)	1 (MS)
2	1	1	2 (MS+2,4-D+ BAP)
3	1	1	3 (MS+TDZ)
4	1	2 (enterrado)	1
5	1	2	2
6	1	2	3
7	2 (3xNaClO)	1	1
8	2	1	2
9	2	1	3
10	2	2	1
11	2	2	2
12	2	2	3
13	3 (NaClO+Fungicda)	1	1
14	3	1	2
15	3	1	3
16	3	2	1
17	3	2	2
18	3	2	3

Variables respuesta evaluadas

1) **Desinfestación del explante**, contando los explantes limpios (1) y contaminados (0) por hongos o bacterias

2) **Limpieza de explante**, tomando como limpia, el área no necrosada del explante (necrosamiento: cambio de coloración del explante a un tono café oscuro a necrótico), con relación al porcentaje del área visible superior del explante en porcentajes de 5 % (5 %, 10 %, 15 %, ..., 100 %).

3) **Respuesta morfogénica**, tomando como explantes respuesta morfogénica (sí: 1, no: 0) a los que presentaron aumento de volumen, deformación o inicio de formación de callo

Para el caso de las variables respuesta 1) y 3), los valores obtenidos son binarios. Para este tipo de valores, la literatura sugiere una regresión logística. La variable respuesta 2) fue analizada mediante un ANOVA clásico, con $\alpha=0.05$.

Los datos para las variables 1 y 3 fueron transformados usando la ecuación " $\sqrt{x+1}$ ", para obtener una aproximación a una distribución normal, siendo x el valor observado (Ribeiro, Santana, Pereira y Santos, 2018; Reyes, 2017). Los análisis de varianza y comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$) se llevaron a cabo mediante el software estadístico R v.4.0.3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfestación del explante

El análisis de varianza (Cuadro 12) mostró que el método de desinfestación por sí mismo, así como la interacción de los métodos de desinfestación con el tipo de siembra y el medio de cultivo por separado tuvieron efecto en la desinfestación de los explantes.

Cuadro 12. ANOVA para la desinfestación de explante a los 35 dds con fuente de variación (FV), grados de libertad (GL), suma de cuadrados (SC), cuadrados medios (CM), F calculada (Fc) y P-valor.

FV	GL	SC	CM	Fc	P-valor
Desinfestación (Des)	2	1.411	0.706	3.760	0.025 *
Siembra (Siem)	1	0.200	0.200	1.066	0.303 ^{ns}

Medio (Med)	2	0.544	0.272	1.449	0.237 ^{ns}
Des*Siem	2	8.033	4.017	21.404	5.6E-9 ^{**}
Des*Med	4	2.789	0.697	3.716	0.006 [*]
Siem*Med	2	0.700	0.350	1.865	0.158 ^{ns}
Des*Siem*Med	4	0.367	0.092	0.489	0.744 ^{ns}
Error	162	30.400	0.188		
CV	15.15 %				

CV de datos transformados ($\sqrt{X + 1}$). *Diferencia altamente significativa, con $\alpha=0.05$,

**Diferencia altamente significativa, ns: diferencia no significativa.

El método de desinfestación que permitió una mejor desinfestación de los explantes fue el método NaClO+Fungicida, seguido de 3X NaClO (Cuadro 13).

Cuadro 13. Comparación de medias de contaminación entre los métodos de desinfestación a los 35 dds.

Desinfestación	Media
NaClO+Fungicida	0.55 a [†]
3X NaClO₂	0.45 ab
NaClO	0.33 b

† Letras distintas son significativamente diferentes (Tukey ≤ 0.05).

Limpieza de explante

El análisis de varianza (Cuadro 14) mostró que no hubo un factor que haya influido en mayor medida la limpieza de los explantes.

Cuadro 14. ANOVA para limpieza de explante a los 35 dds con fuente de variación (FV), grados de libertad (GL), suma de cuadrados (SC), cuadrados medios (CM), F calculada (Fc), P-valor.

FV	GL	SC	CM	Fc	P-valor
Desinfestación (Des)	2	0.243	0.122	2.464	0.088 ^{ns}
Siembra (Siem)	1	0.004	0.004	0.081	0.776 ^{ns}
Medio (Med)	2	0.019	0.009	0.189	0.828 ^{ns}
Des*Siem	2	0.075	0.038	0.764	0.468 ^{ns}
Des*Med	4	0.193	0.048	0.978	0.421 ^{ns}
Siem*Med	2	0.020	0.009	0.198	0.821 ^{ns}

Des*Siem*Med	4	0.328	0.082	1.660	0.162 ^{ns}
Error	162	8.000	0.049		
CV	23.9 %				

ns: diferencia no significativa.

De acuerdo con Azofeifa (2009), el establecimiento *in vitro* de tejidos vegetales de algunas especies vegetales, está, en gran medida, limitado por la ocurrencia del necrosamiento de tejidos, lo cual puede llegar a ser letal en los explantes sembrados *in vitro*, esto constituye uno de los problemas más serios y frecuentes, desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido cultivado *in vitro*.

Respuestas morfogénicas

El análisis de varianza (Cuadro 15) mostró que el método de desinfestación y tipo de siembra fueron los factores simples que influyeron en la respuesta morfogénica, así también la interacción de los métodos de desinfestación con el tipo de siembra y el medio de cultivo, así como la triple interacción de los métodos de siembra con el tipo de siembra y el medio de cultivo.

Cuadro 15. ANOVA de la respuesta morfológica a los 35 dds con fuente de variación (FV), grados de libertad (GL), suma de cuadrados (SC), cuadrados medios (CM), F calculada (Fc) y P-valor.

FV	GL	SC	CM	Fc	P-valor
Desinfestación (Des)	2	1.911	0.956	5.283	0.006 **
Siembra (Siem)	1	2.006	2.006	11.089	0.001 **
Medio (Med)	2	0.144	0.072	0.399	0.671 ^{ns}
Des*Siem	2	5.644	2.822	15.604	6.30E-07**
Des*Med	4	2.489	0.622	3.440	0.009 **
Siem*Med	2	0.878	0.439	2.427	0.092 ^{ns}
Des*Siem*Med	4	2.622	0.656	3.625	0.007 **
Error	162	29.300	0.181		
CV	14.62 %				

CV de datos transformados ($\sqrt{X + 1}$). **Diferencia altamente significativa, ns: diferencia no significativa.

Las comparaciones de medias indicaron que los métodos de desinfestación 3xNaClO y NaClO+Fungicida permitieron una mayor respuesta morfogénica que NaClO (Cuadro 16).

Cuadro 16. Comparación de medias de la respuesta morfológica entre los métodos de desinfestación a los 35 dds.

Desinfestación	Media
3X NaClO	0.58 a [†]
NaClO+Fungicida	0.55 a
NaClO	0.35 b

† Letras distintas son significativamente diferentes (Tukey ≤ 0.05).

Así mismo, el tipo de siembra enterrado fue el que presentó mayor respuesta morfogénica sobre los explantes acostados (Cuadro 17)

Cuadro 17. Comparación de medias de la respuesta morfológica entre los tipos de siembra a los 35 dds.

Siembra	Media
Enterrado	0.60 a [†]
Sumergido	0.39 b

† Letras distintas son significativamente diferentes (Tukey ≤ 0.05).

De acuerdo con Churchill et al. (1973), la formación de callos y plantas a partir de las hojas refleja un rasgo inherente de las orquídeas que es activado por el medio de cultivo y la presencia de reguladores del crecimiento. Algunos autores como Chen et al. (1999) reportaron embriogénesis somática directa a partir de tejidos tomados de hojas jóvenes de *Oncidium* 'Gower Ramsey' a partir de los 20 días después del cultivo utilizando medio MS al 50 % suplementado con 0.3 a 3.0 mg L⁻¹ de TDZ. En el presente estudio, en los tiempos establecidos medios de cultivo y presencia de reguladores y otras condiciones, no se presentaron respuestas para diferenciar nuevos protocormos, ni de embriones somáticos a los 98 días evaluación. en los explantes cultivados que no se contaminaron. Únicamente el tratamiento 6 (T6: presentaron en un inicio la formación de callos derivados principalmente de los haces vasculares (Figura 9) sin que este alcanzara niveles de diferenciación celular.

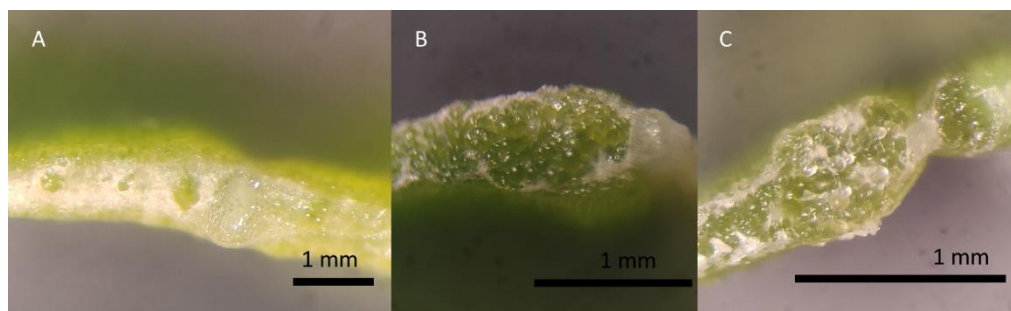


Figura 5: Respuesta morfogénica en hojas. Explantes con crecimiento alrededor de tejido vascular (A) y formación de callo alrededor de tejido vascular (B y C) en T6 a los 35 dds.

Uno de los factores influyentes en la inducción de PLB que ha sido ampliamente evaluado son las concentraciones y posibles combinaciones de reguladores del crecimiento vegetal (PGR). Con base en la literatura actual, la inducción exitosa de PLB parece estar influenciada principalmente por la citoquinina BA (6-benciladenina) y el compuesto similar a la citoquinina TDZ (tidiazuron) y, en algunos casos, la combinación de estas citoquininas con una auxina también resultó beneficioso (Silva, Ferreira, Sampaio, Arruda & Morais, 2016). Los protocolos que citan el uso de citoquinina BA recomiendan concentraciones entre 0.5 mg L^{-1} (Gow, Chen & Chang, 2010) y 20 mg L^{-1} (Park, Murthy & Paek, 2002).

Thidiazuron (TDZ) también parece tener un efecto pronunciado en la inducción directa de PLB en segmentos de hoja de orquídeas, Chen et al. (1999) reportaron la regeneración directa de PLB principalmente de la epidermis y regiones cortadas de segmentos de hojas jóvenes de *Oncidium* 'Gower Ramsey' usando TDZ solo ($0.3\text{--}3.0 \text{ mg L}^{-1}$), en lugar de BA en el medio de cultivo. Para la inducción de PLB con el uso de TDZ, las concentraciones recomendadas oscilan entre 0.25 mg L^{-1} (Zanello, 2019) y 3.0 mg L^{-1} (Chen & Chang, 2006).

CONCLUSIONES

La contaminación sistémica del material puede ser uno de los problemas principales, que limitaron las respuestas en este estudio, se identificó que el método NaClO +Fungicida controló un 55 % la contaminación del material, sin embargo, este es un porcentaje todavía muy alto, por lo que es importante

evaluar diferentes dosis de NaClO, tiempos de exposición y uso de otros funguicidas para hacer más eficiente el establecimiento.

El necrosamiento del material se presentó de la misma manera, sin verse afectado por el método de desinfestación, tipo de siembra o medio de cultivo, por lo que, a pesar que el medio llevaba L-Cisteína, se recomienda probar otros antioxidantes en el medio de cultivo o incluso durante el establecimiento, ya que el oscurecimiento del material podría ser la causa que al final no se lograran obtener PLBs.

Los métodos de desinfestación 3X NaClO y NaClO+Fungicida propiciaron la respuesta morfogénica más alta, lo que consistió en crecimiento del explante, solo el tratamiento T6 presentó formación de callo, sin embargo, no se logró la formación de PLBs, ni brotes.

LITERATURA CITADA

- Azofeifa-Delgado, Á. (2008). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153. <https://doi.org/10.15517/am.v20i1.4990>
- Chen, J. T., & Chang, W. C. (2006). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. *Biologia Plantarum*, 50(2), 169–173. <https://doi.org/10.1007/s10535-006-0002-8>
- Chen, J. T., Chang, C., & Chang, W. C. (1999). Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium Gower Ramsey* and subsequent plant regeneration. *Plant Cell Reports*, 19(2), 143–149. <https://doi.org/10.1007/s002990050724>
- Churchill, M. E., Ball, E. A., & Arditti, J. (1973). Tissue culture of orchids I. Methods for leaf tips. *New Phytologist*, 72(1), 161-166.
- Coutiño-Cortés., A. G. (2016). Variabilidad genética e inducción callogénica *in vitro* de *Guarianthe skinneri* (Orchidaceae). Tesis Doctoral. El Colegio de la Frontera Sur.

- Gerlach, G. (2013). La pesadilla de Lindley - la biología sexual de *Catasetum* y *Cycnoches*. *Lankesteriana*, 13(1–2), 39–46. <https://doi.org/10.15517/lank.v0i0.11532>
- Gow, W. P., Chen, J. T., & Chang, W. C. (2010). Enhancement of direct somatic embryogenesis and plantlet growth from leaf explants of *Phalaenopsis* by adjusting culture period and explant length. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(4), 621–627. <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0438-5>
- Lee-Espinosa, H. E., Murguía-González, J., García-Rosas, B., Córdova-Contreras, A. L., Laguna-Cerda, A., Mijangos-Cortés, J. O., ... Santana-Buzzy, N. (2008). *In vitro* clonal propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* 'Andrews'). *HortScience*, 43(2), 454–458. <https://doi.org/10.21273/hortsci.43.2.454>
- Mathews, V.H. & Rao, P.S., (1985). *In vitro* culture of *Vanda* hybrid (*Vanda* TMA x *Vanda* Miss Joaquim). II. Studies on seedling explant. Proceedings of the Indian National Science Academy, 51(4), 496–504.
- Mitra, G.C., Prasad, R.N. & Roychowdhury, A., (1976). Inorganic salts and differentiation of protocorms in seed callus of orchid and correlative changes in its free amino acid content. *Indian Journal of Experimental Biology*, 14, 350–351
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Park, S. Y., Murthy, H. N., & Paek, K. Y. (2002). Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 38(2), 168–172.

- Reyes-Castañeda, P. (2017). Bioestadística aplicada: agronomía, biología, química (2a Ed.) Editorial Trillas. 216 pp.
- Ribeiro-Oliveira, J. P., Santana, D. G. de, Pereira, V. J., & Santos, C. M. (2018). Data transformation: An underestimated tool by inappropriate use. *Biometry, Modelling and Statistics*, 40(1), 1 – 11.
- Salazar-Mercado, S. A. (2012). Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Cattleya mendelii dombrain* (Orchidaceae). *Acta Agronomica*, 61(1), 69–78.
- SEMARNAT. (2010). *Norma Oficial Mexicana. NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección Ambiental-Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestres-Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio-Lista de especies en Riesgo. Diario Oficial de La Federación*, 78.
- Silva, C. U. de C., Ferreira Pereira, J. A., Sampaio Silva, S., Arruda, E., & Morais, M. (2016). Indução e histologia de embriões somáticos primários e secundários do híbrido *Phalaenopsis* Classic Spotted Pink (Orchidaceae). *Acta Biológica Colombiana*, 21(3), 571.
<https://doi.org/10.15446/abc.v21n3.50032>
- Téllez-Velasco M. Á. A. (2011). Diagnóstico de la familia Orchidaceae en México. Universidad Autónoma de Chapingo. *Edo. de México, México*. 181 p.
- Zanello, C. A., & Cardoso, J. C. (2019). PLBs induction and clonal plantlet regeneration from leaf segment of commercial hybrids of *Phalaenopsis*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 94(5), 627–631.
<https://doi.org/10.1080/14620316.2019.1600384>

Anexo 1: Medio de cultivo basal MS

Constituyentes de stock	Concentración (mg L ⁻¹)
Macroelementos	
KNO ₃	1 900
NH ₄ NO ₃	1 650
CaCl ₂ H ₂ O	440
MgSO ₄ 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Microelementos	
MnSO ₄ 4H ₂ O	15.6
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	37.3
Vitaminas	
Inositol	100
Tiamina	0.1
Piridoxina	0.5
Ácido nicotínico	0.5
Aminoácidos	
L-Cisteína	60
Glicina	2
Carbohidrato	
Sacarosa	30 000
Otros	
Adenina	10