



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



**CENTRO UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO**

**Evaluación del ácido salicílico en la aclimatación *ex vitro* de microplantas de *Laelia autumnalis* (Lex.) Lind., *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp.**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO  
EN FLORICULTURA

P R E S E N T A

JUAN MANUEL OLIVARES AGUILAR

DIRECTORA:

DRA. EN C. MARTHA ELENA MORA HERRERA

ASESORES

DR. EN C. JUAN CARLOS REYES ALEMÁN

DR. EN C. RÓMULO GARCÍA VELASCO

Tenancingo, Estado de México; noviembre 2020

*En la evolución no existe la planeación, sólo el ciego azar.  
Pero en el momento en el que la orquídea tropezó con una de  
las llaves del deseo humano y la utilizó para abrir nuestros  
corazones, conquistó todo un mundo nuevo, el nuestro.*

*Michael Pollan*

# ÍNDICE

RESUMEN.....	6
I. INTRODUCCIÓN .....	8
II. ANTECEDENTES.....	10
2.1 Generalidades de la familia <i>Orchidaceae</i> .....	10
2.2 Morfología de la familia <i>Orchidaceae</i> .....	11
2.2.1 Hábito de crecimiento .....	11
2.2.2 Raíz .....	12
2.2.3 Tallo .....	13
2.2.3.1 Pseudobulbo.....	14
2.2.4 Hojas .....	15
2.2.5 Flor y Fruto.....	16
2.2.6 Semillas .....	18
2.3 Especies del estudio .....	19
2.3.1 <i>Laelia autumnalis</i> (La Llave & Lex.) Lindl. ....	19
2.3.2 <i>Epidendrum</i> sp. L.....	21
2.3.3 <i>Encyclia</i> sp. Lex (Schltr.).....	23
2.4 Problemas de conservación de la familia <i>Orchidaceae</i> .....	24
2.4.1 Alternativas de conservación .....	25
2.4.2 Conservación <i>in situ</i> .....	25
2.4.3 Conservación <i>ex situ</i> .....	26
2.4.3.1 Cultivo <i>in vitro</i> .....	27
2.4.3.2 Aclimatación .....	28
2.4.3.3 Aclimatación en orquídeas .....	29
2.5 Ácido salicílico (AS).....	30
2.5.1 El ácido salicílico como molécula de señalización en plantas .....	31
2.5.2 El AS y la aclimatación .....	31
2.5.3 Importancia de ácido salicílico (AS) en las respuestas de estrés.....	33
III. JUSTIFICACIÓN .....	35
IV. HIPÓTESIS.....	36

V. OBJETIVOS.....	37
5.1 GENERAL:.....	37
5.2 ESPECÍFICOS:.....	37
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
6.1 Sitio experimental y material biológico.....	38
6.2 Descripción del experimento.....	38
6.3 Condiciones de cultivo.....	39
6.4 Medios de cultivo.....	40
6.5 Solución concentrada de ácido salicílico (AS).....	43
6.6 Incubaciones <i>in vitro</i> con ácido salicílico.....	43
6.7 Siembra en suelo.....	43
6.7.1 Evaluación de la supervivencia.....	43
6.8 Evaluación de la actividad enzimática peroxidasa, y contenido fenólico.....	44
6.8.1 Cuantificación de la actividad enzimática peroxidasa.....	44
6.8.2 Cuantificación del contenido fenólico.....	45
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
7.1 Selección, multiplicación y estandarización de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> , <i>Epidendrum</i> sp. y <i>Encyclia</i> sp.....	46
7.2 Evaluación el efecto del AS en microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> , <i>Epidendrum</i> sp. y <i>Encyclia</i> sp. en la longitud del tallo y de raíz, y peso fresco.....	47
7.2.1 Evaluación en la longitud del tallo en <i>Laelia autumnalis</i> , <i>Epidendrum</i> sp. y <i>Encyclia</i> sp. ....	47
7.2.2 Evaluación en la longitud de raíz en <i>Laelia autumnalis</i> , <i>Epidendrum</i> sp. y <i>Encyclia</i> sp. ....	48
7.2.3 Evaluación del peso fresco en <i>Laelia autumnalis</i> , <i>Epidendrum</i> sp. y <i>Encyclia</i> sp. ....	51
7.3 Evaluación de la supervivencia <i>ex vitro</i> de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> , <i>Epidendrum</i> sp. y <i>Encyclia</i> sp. precultivadas en AS. ....	53
7.3 Evaluación de la actividad enzimática de las peroxidasas en hoja y raíz de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> , <i>Epidendrum</i> sp. y <i>Encyclia</i> sp. ....	56
7.3.1 Evaluación de la actividad enzimática de las peroxidasas en hoja de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> , <i>Epidendrum</i> sp. y <i>Encyclia</i> sp.....	56
7.3.2 Evaluación de la actividad enzimática de las peroxidasas en raíz de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> , <i>Epidendrum</i> sp. y <i>Encyclia</i> sp.....	57

<b>7. 4 Evaluación del contenido de compuestos fenólicos en hoja y raíz de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i>, <i>Epidendrum</i> sp. y <i>Encyclia</i> sp. precultivadas en AS.</b> .....	60
<b>7.4.1 Evaluación del contenido de compuestos fenólicos en hoja de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i>, <i>Epidendrum</i> sp. y <i>Encyclia</i> sp. precultivadas en AS.</b> .....	60
<b>7.4.2 Evaluación del contenido de compuestos fenólicos en raíz de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i>, <i>Epidendrum</i> sp. y <i>Encyclia</i> sp. precultivadas en AS.</b> .....	62
<b>VIII. CONCLUSIONES</b> .....	65
<b>IX. REFERENCIAS</b> .....	66
<b>IXI. ANEXOS</b> .....	82

## RESUMEN

La familia *Orchidaceae* tiene gran distribución y diversidad en el país y en el Estado de México, es una de las más amenazadas por el cambio de uso de suelo y tráfico ilegal de ejemplares. Entre las técnicas de conservación *ex situ* se encuentra la multiplicación *in vitro*, donde se obtienen miles de ejemplares, pero existe una gran tasa de mortalidad en el proceso de aclimatación *ex vitro* donde el desarrollo de las raíces y la biomasa son necesarios para lograr un mayor porcentaje de supervivencia. En décadas recientes el ácido salicílico (AS), se ha estudiado por su efecto en la respuesta ante estrés biótico y abiótico; por lo que el propósito de este trabajo es utilizar AS en condiciones *in vitro* para favorecer la aclimatación y supervivencia *ex vitro* de microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp.

Microplantas de *L. autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp. se sembraron en medio Murashige-Skoog (MS) adicionando con 0, 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$  de AS cultivándose durante  $120 \pm 4$  días. Concluido el tiempo se evaluó la longitud del tallo y raíz, peso fresco de la planta, se cuantificó el contenido fenólico y actividad enzimática de las peroxidases en hoja y la raíz. Posteriormente las plantas se trasplantaron a almácigos y se mantuvieron en condiciones para su aclimatación *ex vitro*, se evaluó la supervivencia 30 días después. Los resultados fueron analizados por promedios  $\pm$  error estándar en una prueba ANOVA Duncan ( $\alpha = 0.05$ ).

Microplantas de las tres especies tratadas con AS incrementaron el peso fresco siendo el tratamiento de AS 10  $\mu\text{M}$  el mayor en las tres especies. En las tres especies, las microplantas tratadas con AS 10  $\mu\text{M}$  presentaron un incremento significativo en el contenido fenólico en las hojas, por el contrario, el contenido disminuyó en la raíz respecto al control.

Las microplantas tratadas con AS en las tres especies presentaron respuestas diferenciales en los diferentes parámetros evaluados. Microplantas de *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp. tratadas con AS muestran un incremento en la longitud de tallo, la raíz y en la actividad enzimática de las peroxidases en las raíces mientras que en

*L. autumnalis* éstas disminuyeron respecto a su control. Microplantas de *L. autumnalis* y *Encyclia* sp. tratadas con AS señalan un incremento en la actividad enzimática peroxidasa en las hojas, en *Epidendrum* sp. esta disminuyó. Microplantas de *L. autumnalis* tratadas con AS disminuyeron el contenido fenólico en las raíces respecto al control. En *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp. el tratamiento de AS 1  $\mu$ M incrementó el contenido de fenoles en hoja y raíz respecto a su control y presentan valores similares.

El conjunto de las respuestas inducidas por el AS indujo tolerancia ante estrés, lo que permitió un aumento significativo en la supervivencia con respecto al testigo en las tres especies.

## I. INTRODUCCIÓN

En México las orquídeas son uno de los recursos florísticos con mayor riqueza en especies y valor cultural y económico que han sido utilizadas desde tiempos precolombinos por varios grupos étnicos para satisfacer diversas necesidades como medicinal, ceremonial, alimentario, ornato y como fuente de ingreso por la venta de ejemplares (Hernández, 1959; Sahagún, 2006; Flores-Palacios y Valencia-Díaz, 2007 en Emeterio, 2014). Un ejemplo es el de la Vainilla, (*Vanilla planifolia* L.), nativa de nuestro país es la única especie de orquídea comestible y cuenta con registros históricos sobre su uso etnográfico como en el famoso Códice Florentino o escritos como Historia Natural de la Nueva España (Emeterio, 2014).

México es el segundo productor latinoamericano de orquídeas (en particular, es el séptimo productor global de *Phalaenopsis*, de alto valor ornamental) después de Brasil y el tercer lugar mundial de plantas de ornato. (Reyna, 2019). A pesar de estos importantes indicadores, en México la producción de orquídeas no destaca por el uso sustentable de orquídeas nativas, al contrario, existe un importante mercado negro; Flores-Palacios (2002, en Menchaca-García *et al.*, 2011) señala sin cifras exactas, que en nuestro país se trafican más orquídeas silvestres que las vendidas legalmente, estimaciones de la década de los noventa señalan un tráfico ilegal de 12 millones de plantas mientras que sólo se vendieron legalmente 152 000. El saqueo de grandes volúmenes de varias especies de orquídeas del campo, se debe a que los pobladores no conocen su potencial ornamental ni los recursos económicos que podían generarles a futuro bajo un buen manejo sustentable (Menchaca-García *et al.*, 2011).

En México el comercio de orquídeas silvestres está permitido en viveros autorizados, en Unidades de Manejo Ambiental (UMA) pero a pesar de la demanda que tienen las orquídeas, son pocos los centros autorizados en el país.



Tejeda-Sartorius *et al.* (2017a) mencionan que la introducción de orquídeas silvestres con atributos ornamentales para propagación masiva y metas comerciales, es una tarea complicada. Los géneros y especies consolidadas han requerido una extensa investigación de protocolos de propagación, manejo hortícola, mejoramiento o transformación genética, etcétera. Es necesaria la propagación de especies silvestres para su conservación. En México, por los problemas de extracción ilegal y el deterioro de hábitats naturales, toda forma de conservación de orquídeas es necesaria (Tejeda-Sartorius *et al.* 2017b).

La conservación de recursos fitogenéticos nativos involucran diversas técnicas de cultivo y preservación *in vitro*, entre las ventajas de dichas técnicas se encuentra el estudio de factores ambientales que influyen en el desarrollo y la floración de las orquídeas (Pedraza-Santos, 2017), pero a pesar del éxito en condiciones de laboratorio, el proceso de adaptación de los ejemplares a condiciones naturales, conocido como aclimatación, una etapa crítica donde se pierde un gran porcentaje de plantas causado por estrés biótico y abiótico (Kozai, 1991; van Huylendroeck *et al.*, 1998). En el caso de orquídeas, para aumentar los porcentajes de supervivencia, se han realizado diversos estudios donde se evalúan parámetros tales como los sustratos, la humedad o la intensidad lumínica (Murillo, 2016 en Predaza-Santos, 2017, Venturieri y Arbiato 2011 y Venturieri y Séidel-Junior, 2011), omitiendo los aspectos fisiológicos que intervienen en el desarrollo y las respuestas al estrés que a su vez influyen en la supervivencia.

El ácido salicílico es una fitohormona involucrada en la inducción de respuestas ante estrés biótico y abiótico por lo que en este trabajo se empleó para coadyuvar en la aclimatación a condiciones *ex vitro* de orquídeas.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades de la familia *Orchidaceae*

México cuenta con una variedad de condiciones climáticas, geológicas y biológicas; dando como resultado una gran diversidad biológica. La flora fanerogámica de México se calcula aproximadamente en 220 familias, 2410 géneros y 22000 especies (Téllez-Velasco *et al.*, 2011a). De los grupos taxonómicos mejor representados en la flora mexicana conocida se enlistan seis familias entre las cuales esta *Orchidaceae* (Rzedowski, 1991).

La familia *Orchidaceae* presenta 25,000 especies, (Chase *et al.*, 2003 en Dixon *et al.* 2003). Actualmente formada por 5 subfamilias: *Apostasioideae*, *Cypripedioideae*, *Epidendroideade*, *Orchidoideae*, y *Vanilloideae*, de las cuales las cuatro últimas están presentes en México, ya que la subfamilia *Apostasioideae* se encuentra únicamente en el sureste asiático. La subfamilia *Epidendroideae* es la más diversa, tanto en número de especies y géneros (cerca de 600) como en hábitos, formas de vida, intervalo de tamaños y estrategias reproductivas, la mayoría son especies epífitas. En México la subfamilia *Vanilloideae* está representada sólo por el género *Vanilla*, que incluye a la vainilla (*V. planifolia*) (Soto-Arenas y Salazar, 2004 en García-Mendoza *et al.*, 2004).

En México se tienen registradas aproximadamente 1260 especies, de las cuales 300 son endémicas (Soto-Arenas *et al.*, 2007 en Emeterio, 2014), los géneros más importantes son: *Cattleya*, *Laelia*, *Epidendrum*, *Encyclia*, *Oncidium*, *Brassia*, *Sobralia*, *Stanhopea*, *Odontoglossum*, *Lemboglossum*, *Gongora*, y *Lycaste*. (Navarro-López *et al.*, 2001). El Estado de México ocupa el tercer lugar a nivel nacional en diversidad de especies de orquídeas (Ceballos *et al.*, 2009), Szeszko-Fabila (2010) reporta 258 especies en el territorio estatal. Soto-Arenas (1993; en Pridgeon, 1994), asegura que “las orquídeas se concentran generalmente en áreas muy específicas, que son importantes por la riqueza y diversidad de sus poblaciones o por sus endemismos”.

## 2.2 Morfología de la familia *Orchidaceae*

La familia *Orchidaceae*, presenta características muy diversas en los aspectos morfológicos, entre géneros relacionados incluso entre las especies. Son plantas herbáceas, perennes (raramente anuales), terrestres o epífitas, ocasionalmente trepadoras, algunas veces saprófitas o raramente micoparásitas (Téllez-Velasco *et al.*, 2011a).

### 2.2.1 Hábito de crecimiento

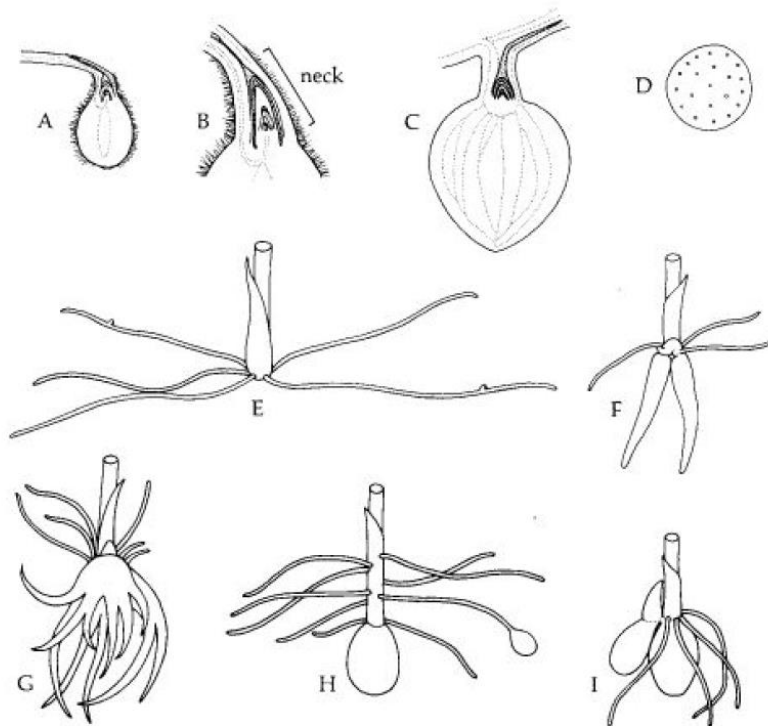
Se presentan dos tipos de crecimiento. El hábito monopodial donde el desarrollo se lleva a cabo a partir de un meristemo, desarrollando un solo eje llamado monopodio, como en el género *Phalaenopsis*. Y el hábito simpodial, formado por una serie de vástagos a partir de meristemos o yemas, situadas de forma basal, lateral o apicalmente en el vástago anterior, donde el conjunto forma un eje compuesto o simpodio, como en los géneros *Cattleya* y *Laelia* (Figura 1). Es muy probable que este tipo de hábito sea la condición ancestral de la familia (Sarmiento y Romero, 2000).



**Figura 1.** Hábitos de crecimiento de una orquídea: monopodial (izquierda) y simpodial (derecha) tomada de Echeverri *et al.* (2001).

### 2.2.2 Raíz

Las orquídeas no tienen una raíz principal, su sistema de raíces se constituye de raíces secundarias, pero sin llegar a ser fibrosas como en otras monocotiledóneas (Figura 2) como los pastos (Dressler, 1993). Su anatomía consiste en un cilindro vascular central rodeado de una endodermis, envuelta a su vez por la corteza, esta última constituye la mayor parte del volumen de la raíz y se encuentra delimitada hacia afuera por la exodermis, formada por algunas células de pared gruesa e impermeable y otras delgadas que permiten el paso de agua hacia el exterior de la corteza (Nava, 2008 en Emeterio-Lara *et al.*, 2016).



**Figura 2.** Diferentes tipos de forma y distribución de las raíces. Tomado de Dressler (1981).

En las orquídeas epífitas, en la porción más externa de la raíz, la epidermis, se suele formar un tejido esponjoso denominado velamen, constituido por células que al madurar mueren y pierden el citoplasma quedando solo sus paredes parcialmente engrosadas (Hágsater *et al.*, 2005). El velamen puede ser de color verde o blanco;

este color lo adquieren porque en él se realiza la producción de alimento por medio de la fotosíntesis (Figura 3), incluso, hay especies en los que todo el proceso lo realizan las raíces, desapareciendo las hojas por completo (Sarmiento y Romero, 2000). Al contacto con el agua de lluvia, neblina o vapor de agua o rocío el velamen se embebe con rapidez y entonces la humedad está disponible para ser absorbida por la raíz. El velamen es muy típico de las epífitas, pero también está presente muchas terrestres y su función radica en evitar la pérdida de agua, participar en la condensación del vapor de agua y la entrada de patógenos (Dressler, 1993).



**Figura 3.** Raíz de una orquídea epífita. Véase la capa blanca del velamen y el extremo color verde ya que también cumple una acción fotosintética. Tomado de Rittershausen y Rittershausen (2006).

### 2.2.3 Tallo

El tallo de las orquídeas es similar a otras monocotiledóneas, con forma de caña, formada por segmentos o entrenudos delimitados por nudos donde se originan las hojas, vainas o escamas foliares. Existen tallos subterráneos que son los cormos y raíces tuberosas que funcionan como órganos de reserva de agua y otras sustancias (Téllez-Velasco *et al.*, 2011a).

### 2.2.3.1 Pseudobulbo

Es un término aplicado al tallo grueso aéreo de las orquídeas epífitas, que no es bulbo ni tubérculo, puede ser un solo entrenudo engrosado (heteroblástico) o varios (homoblástico). La mayoría de los pseudobulbos de especies epífitas poseen una cutícula impermeable al agua y gases, por lo que son estructuras de almacenamiento y reserva que han ayudado a la distribución en hábitats secos. Un pseudobulbo con varios entrenudos, puede tener varias hojas a lo largo de su estructura o solo en el ápice (Figura 4). La estructura opuesta es otro tipo de tallo modificado, nombrado cormo, que es una estructura subterránea, típica de géneros como *Bletia*, *Eulopia*, *Spathoglottis*, *Govenia*, *Liparis* y *Malaxis*, es decir, de orquídeas terrestres (Dressler, 1993). Los dos tipos de tallos constituyen una estructura con función de almacenamiento de agua y nutrientes de reserva como carbohidratos, Fósforo, Nitrógeno (Ng y Hew, 2000), que son utilizados al menos en parte para sustentar la producción de flores y frutos, así como el desarrollo de nuevos vástagos (Hágsater *et al.*, 2005).

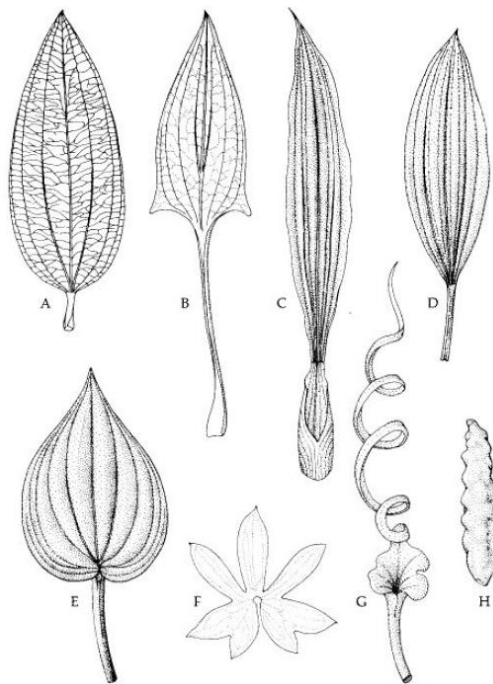


**Figura 4.** Ejemplo de los diferentes tipos de tallos en las orquídeas. Tomado de Squire (2004).

### 2.2.4 Hojas

La mayoría de las orquídeas poseen hojas como el resto de las monocotiledóneas, con nervadura paralela, adoptan diferentes formas, tamaños y consistencias dados los diversos hábitats en el que se desarrollan (Sarmiento y Romero, 2000). En orquídeas terrestres, las hojas son delgadas y flexibles, desapareciendo con la temporada seca o invernal (Secretaría del Medio Ambiente, 2010, en Emeterio-Lara *et al.* 2016).

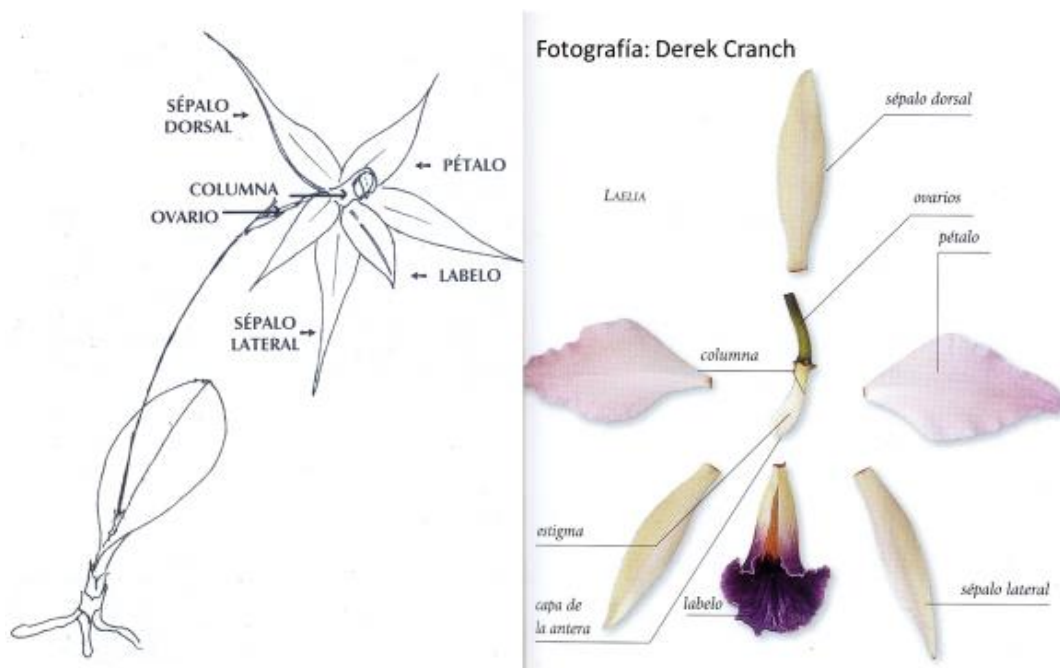
En muchas orquídeas epífitas, las hojas tienen un grado de succulencia, desempeñando la función de producción y almacenamiento de nutrientes y presentan una capa de células externas resistente a la desecación; otras especies poseen hojas casi cilíndricas y rígidas, típicas de un hábitat cálido con exposición directa al sol, para evitar el sobrecalentamiento y la deshidratación (Nava, 2008 en Emeterio-Lara, 2016). En las epífitas miniaturas de la subtribu *Pleurothallidinae* existe un tejido bajo la epidermis del haz de la hoja cuya función es el almacenamiento de agua. Existen otras hojas vellosas, con pelos o tricomas que sirven como protección contra la falta de humedad y depredadores (Sarmiento y Romero, 2000).



**Figura 5.** Varios tipos de hoja en las orquídeas. Tomado de Dressler (1981).

### 2.2.5 Flor y Fruto

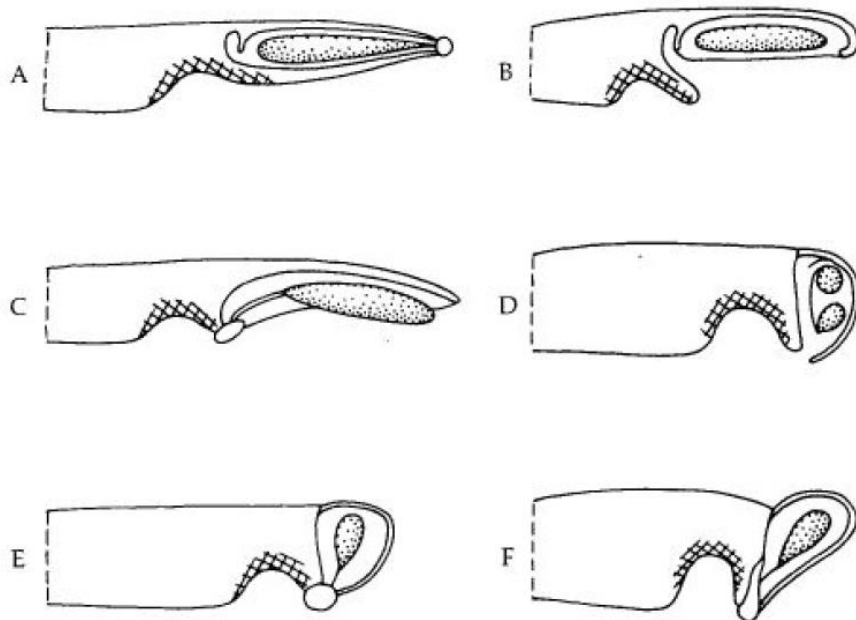
Las flores son hemafroditas, es decir en la misma flor se presentan los dos sexos, pero existen también flores unisexuales, como en los géneros *Catasetum*, *Mormodes* y *Cycnoches* (Suárez y Mora, 2007 en Téllez-Velasco y Flores-Villanueva, 2007). La flor presenta una simetría bilateral, cuyo tamaño varía desde 3mm hasta 25 cm de diámetro (Téllez-Velasco *et al.*, 2011a). Perianto formado de seis segmentos libres o unidos, los tres exteriores llamados sépalos son semejantes entre sí o el dorsal diferente, los laterales con frecuencia unidos y prolongándose más allá de su base en un mentón, los tres segmentos interiores son los pétalos alternando con los sépalos, los laterales semejantes entre sí y el tercero, muy variadamente modificado, constituye el labelo (Figura 6), cuya superficie superior interna se denomina disco y con frecuencia está provista de papilas, surcos, lamelas, etc., a los que se les llama callos. Por lo general, el labelo es la parte más vistosa de la flor y una de sus funciones es servir como guía o plataforma de aterrizaje al polinizador (Figura 6).



**Figura 6.** Estructura básica de una flor de orquídea. Tomado de Echeverri *et al.* (2001) y de Rittershausen y Rittershausen (2006).



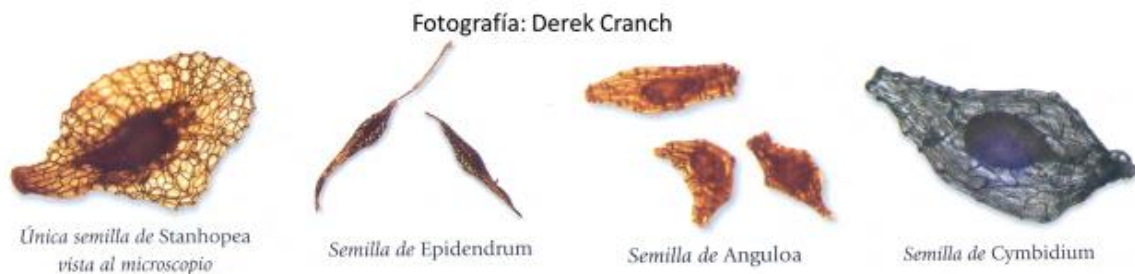
El aparato reproductor femenino (pistilo) y el masculino (antera) están fusionados en una estructura llamada columna o ginostemio ubicada en el centro de la flor. En la parte superior de la columna se encuentra la antera, debajo de ésta el estigma, separada por un tejido llamado rostelo, su función es evitar la autopolinización. En la flor los granos de polen se aglutinan en pequeños paquetes llamados polinios cuyo número varía según el género. En la base del polinio existe una estructura llamada viscidio, que es una base cubierta de mucílago y cumple la función de adherirse a los polinizadores. Polinios y viscidio forman el polinario, que es lo que los polinizadores llevan a otra flor u otra planta. Las flores poseen una gran diversidad de colores y tonalidades, hay algunas que no tienen olor mientras que la gran mayoría posee una variedad de fragancias que van desde lo agradable hasta lo desagradable para el olfato humano. Fruto por lo general capsular, compuesto de al menos dos carpelos, abriéndose por 1, 2, 3 ó 6 valvas longitudinales que se conservan unidas apicalmente (Dressler, 1993; Peña, 1990 en Rzedowski y Rzedowski, 2010; Nava, 2008 y Secretaría del Medio Ambiente, 2010 en Emeterio-Lara *et al.*, 2016, Hágsater *et al.*, 2005 y Téllez-Velasco *et al.*, 2011a).



**Figura 7.** Formas diversas de la columna y la relación entre antera y estigma. Polen en punteado y estigma en sombreado, en C y E puede distinguirse el viscidio como la pequeña línea que sostiene el polen, en B se puede apreciar el rostelo como una protuberancia. Tomado de Dressler (1981).

### 2.2.6 Semillas

La morfología general de las semillas de orquídeas varía desde filiforme, fusiforme a elipsoidal, en algunos géneros se observan apéndices semejantes a alas o protuberancias, cuya función está relacionada con la dispersión, son muy pequeñas, entre 1-2 mm de largo y 0.5-1 mm de ancho y contienen poca o ninguna reserva para llevar a cabo la germinación, es decir, no presentan endospermo (McKendrick, 2000), la testa está formada por un conjunto de células muertas en forma de red (Molvray y Kores, 1995) y se compone hasta de un 96% de aire, lo que facilita su dispersión (Sahoo *et al.*, 2000) (Figura 8). El embrión tiene aspecto ovoide, y generalmente, se sitúa en el centro de la semilla, que necesita fuentes de nutrición externas hasta desarrollarse lo suficiente como para sobrevivir de una forma autótrofa, dichos nutrientes en su hábitat natural se obtienen de la asociación con hongos micorrízicos (Kuang y González, 1993) (Figura 8). El número de semillas por fruto varía de uno a cuatro millones (Arditti y Abdul, 2000 en Ayuso, 2017). Estas características producen una escasa germinación y por lo tanto multiplicación de individuos, se estima que la tasa de germinación en la naturaleza es de un 2 o 3% (Mayo *et al.*, 2010 en Bermeo y Sari, 2018).



**Figura 8.** Algunas semillas de orquídeas. Tomado de Rittershausen y Rittershausen (2006).

### **2.3 Especies del estudio**

Emeterio (2014), menciona que la adquisición de orquídeas en muchas de las ocasiones va más allá de la presencia física de las flores, ya que se espera que con la obtención de las estructuras vegetativas en un futuro produzcan flores que las personas perciben como exóticas, sofisticadas y elegantes.

Esto significa que el tráfico de orquídeas además de especies nativas reconocidas o con algún aprovechamiento tradicional, se incrementa a especies y poblaciones que históricamente no han presentado tales amenazas.

Las especies del presente trabajo fueron seleccionadas porque se ha reportado su colecta y comercialización en el sur del Estado de México en el caso de *Laelia autumnalis* (Emeterio, 2014), así como géneros de orquídeas nativas del Estado de México que se encuentran en riesgo de conservación o bien son vulnerables a las prácticas de saqueo y comercialización como *Encyclia* y *Epidendrum* (Szeszko-Fabila, 2010).

#### **2.3.1 *Laelia autumnalis* (La Llave & Lex.) Lindl.**

Planta epífita o litófita, de 50-100 cm de alto incluyendo la inflorescencia, rizoma evidente de 2-3 por 0.1 -0.3 cm. Pseudobulbos bi-trifoliados, fusiformes a ovoides, cónico-ovoide a subgloboso, levemente comprimidos, sulcados longitudinalmente, color verde oscuro, de 3 a 4 entrenudos, de 6.0-15 cm de largo por 2.5-5.0 cm de ancho, presenta restos papiráceos-escariosos de las hojas. Hojas oblongo-lanceoladas, coriáceas, carnosas, ligeramente carinadas, verde oscuro, a veces teñida de color púrpura de 7.5-23 por 2.3-3.8 cm. Inflorescencia de 40 a 100 cm., en forma de racimo laxo, brácteas subtriangulares, escariosas, color blanco-marrón, racimo entre 3-13 flores, brácteas florales triangular-ovadas, cubierta, marrón blanquecino, 9-21 por 7-14 mm (Emeterio, 2014).

Flores grandes y vistosas de 6.5 a 12 cm de diámetro, resupinadas, tépalos lila a magento oscuro, a veces rosado a magenta con blanco. Labelo trilobado, los lóbulos laterales de color lila con blanco abrazando a la columna, más grandes que el lóbulo medio que es de color lila magenta; callo blanco o amarillo en la parte media basal, con rayas de color violeta y puntos cerca de la base, y una fila de puntos desde el vértice del callo hacia el lóbulo medio. Columna blanca, a veces con manchas moradas en la parte ventral, fragancia débil a intensa a la luz del día (Figura 9) (Emeterio, 2014).



**Figura 9.** *L. autumnalis*, detalle de la flor y venta de ejemplares extraídos de su hábitat en el municipio de Tenancingo, Estado de México. Tomado de Emeterio (2014).

El fruto es una cápsula elipsoide, fusiforme, trígona, glauca, de 27 a 37 mm de largo por 10 mm de ancho. *Autumnalis* = autumnal, por florecer en otoño (Nava, 2008; en Emeterio-Lara, 2014; Szeszko-Fabila, 2010 y Halbinger *et al.*, 1997).

**Hábitat:** se distribuye en los bosques de encino húmedo, bosque mixto de pino-encino y bosque mesófilo de montaña a una altura promedio de 1400 a 2700 msnm, florece de septiembre a noviembre, a veces se prolonga hasta diciembre (Nava, 2008; Halbinguer *et al.*, 1997 y Calderón de Rzedowski y Rzedowski, 2010 en Emeterio,2014).

**Distribución:** La Asociación Mexicana de Orquideología (AMO), registra la especie al noroeste de Sonora, en Durango, Jalisco, Michoacán, Estado de México, Morelos, Hidalgo y el norte de Guerrero (Halbinger *et al.*, 1997), Nayarit, Colima, Guanajuato. Especie típica de las montañas del centro de México y endémica del país (Nava, 2008 en Emeterio, 2014).

**Estado de conservación:** Szeszko-Fabila (2010) menciona que si bien esta especie no está clasificada por la SEMARNAT como especie amenazada, las poblaciones se han visto notoriamente deterioradas por la extracción de ejemplares para satisfacer el mercado negro, siendo una práctica no sostenible que puede tener como consecuencia la extinción en estado silvestre de la especie ya que la reproducción en campo es muy tardada dado que requiere alrededor de siete años desde la germinación hasta el desarrollo de la primera flor. Emeterio (2014), enlista a esta especie en su trabajo acerca del aprovechamiento y uso de orquídeas silvestres en el sur del estado de México, señalando la extracción y venta de ejemplares fuera de su hábitat natural para el mercado negro y por su uso tradicional en festividades en municipios del sur del Estado de México.

Szeszko-Fabila (2010) hace hincapié en hacer una reevaluación de su estado de conservación, al menos en el Estado de México.

### **2.3.2 *Epidendrum* L.**

*Epidendrum* sp. es un género nativo del continente americano con cerca de mil especies distribuidas principalmente en la zona tropical y subtropical (Bellone, 2006).

Plantas epífitas o rupícolas, a veces terrestres, erectas o rastreras, con o sin rizoma conspicuo; tallos en forma de carrizo, en ocasiones formando pseudobulbos, simples o muy ramificados; hojas una a numerosas, cilíndricas o aplanadas, lineares a ovales; inflorescencia generalmente terminal, en forma de racimo o panícula con flores de tamaño más bien mediano (Figura 10); sépalos sublinguales, por lo común libres; pétalos parecidos a los sépalos, pero con frecuencia más angostos, labelo simple a tripartido, unido totalmente a la columna; ésta corta o larga, a veces alada

o auriculada; antera terminal, bilocular, operculada, polinios 4, cerosos, rostelo laminar, profundamente dividido por una hendidura paralela al eje de la columna; cápsula con frecuencia elipsoide, rara vez triangular en corte transversal (Peña, 1990 en Rzedowski y Rzedowski, 2010).



Izq: (c) Jesús G. González Gallegos, algunos derechos reservados (CC BY-NC)  
Der: (c) Víctor De la Cruz, algunos derechos reservados (CC BY)

**Figura 10.** Flores del género *Epidendrum*, ambas especies mostradas están presentes en el Estado de México (Szeszko-Fabila, 2010).

**Estado de conservación:** para el Estado de México, Szeszko-Fabila (2010) reporta ceca de 15 especies con una amplia distribución y distintos estados de conservación, en su mayoría sin riesgo; pero estas especies son comunes de los bosques templados que es el más amenazado por el cambio de uso de suelo.

Por otra parte, Emeterio (2014) en su trabajo sobre el aprovechamiento de orquídeas silvestres en el sur del estado de México no enlista a ninguna especie de este género.

### **2.3.3 *Encyclia* Lex (Schltr.)**

Plantas herbáceas o subarborescentes, epífitas o terrestres; pseudobulbos presentes, ovoides o ligeramente aplanados, con 1 a 4 hojas coriáceas, generalmente grandes; inflorescencias terminales, en forma de racimos o panículas, con flores de tamaño mediano o relativamente grandes; sépalos y pétalos semejantes entre sí; labelo trilobado, libre o adherido sólo en la base con la columna, por lo general los lóbulos laterales envuelven a la columna, ésta con frecuencia alada cerca del ápice; polinios 4, aplanados lateralmente, clinandrio tridentado o trilobado, rostelo grueso, generalmente perpendicular al eje de la columna; cápsula fusiforme, a veces triangular o fuertemente alada. Más de 100 especies en América tropical, con más de dos terceras partes existen en México (Peña, 1990 en Rzedowski y Rzedowski, 2010).

El género estuvo clasificado dentro de *Epidendrum*. Hooker describió el género en 1828 pero no fue aceptado hasta 1961 gracias a los trabajos de Robert Dressler, de igual manera de *Encyclia* se han separado los géneros *Euchile*, *Dinema*, y *Prostechea*. La especie tipo es *Encyclia viridiflora* (Bellone, 2006).

**Estado de conservación:** para el Estado de México, Szeszko-Fabila (2010) reporta 6 especies en su mayoría típicas de la selva baja caducifolia, la mayoría con estados de conservación en riesgo o en peligro, puede que la especie de mayor importancia es *E. adenocaula* (Figura 11) que se encuentra en peligro de extinción (Téllez-Velasco, 2011b). Por el contrario, Emeterio (2014) en su trabajo sobre el aprovechamiento de orquídeas silvestres en el sur del Estado de México no enlista a ninguna especie de este género, a pesar de que las especies del género se encuentran distribuidas en la región del estudio (Szeszko-Fabila 2010).



Izquierda: (c) Quinn Dombrowski, some rights reserved (CC BY-SA), Jesús Moreno Navarro CONABIO.  
Derecha: Olivares-Aguilar 2016.

**Figura 11.** Flores del género *Encyclia*, ambas especies mostradas están presentes en el Estado de México (Szeszko-Fabila, 2010).

#### **2.4 Problemas de conservación de la familia *Orchidaceae***

Las orquídeas, afrontan problemas de disminución de sus poblaciones, derivado de la destrucción del hábitat y el saqueo de ejemplares. Por lo que son especialmente vulnerables a la extinción (Turner *et al.*, 1994 en Emeterio-Lara *et al.*, 2016 y Salazar-Rojas *et al.*, 2007), por ello están catalogadas como el segundo grupo de plantas con más especies protegidas en México después de la familia *Cactaceae* (SEMARNAT, 2010).

En la NOM-059-SEMARNAT-2010, se cuentan 188 especies en las siguientes categorías de riesgo: 15 especies se encuentran en peligro de extinción (P), de las cuales 6 son endémicas, 58 amenazadas (A) con 25 endémicas, 102 especies raras (R) con 35 endémicas y 4 especies sujetas a protección especial, de las cuales 3 son endémicas (Sarmiento y Romero, 2000).



#### **2.4.1 Alternativas de conservación**

Existen dos tipos de conservación de las especies, *in situ* y *ex situ*. La conservación *in situ* se refiere al mantenimiento de las especies en su ambiente original, es la ideal y más importante ya que permite la variación genética de las especies, así como conservar el delicado equilibrio de sus interacciones con otros organismos y la posibilidad de seguir evolucionando. La estrategia de conservación *ex situ* tiene dos principales variantes, la propagación y el mantenimiento de las especies que ya no pueden subsistir en la naturaleza y otra modalidad que comprende la propagación masiva y subsecuente comercialización de especies, que reduzca y desaliente la colecta de ejemplares de la naturaleza (González-Castellanos, 2014).

#### **2.4.2 Conservación *in situ***

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, define a los productos forestales no maderables (PFNM) como aquellos recursos de origen biológico, distintos de la madera, que se obtienen de los bosques (animales, hongos, frutos, gomas, resinas, plantas medicinales, productos artesanales y ornamentales (FAO, 2005 en Menchaca-García *et al*; 2012). Las orquídeas pertenecen a este tipo de recursos.

La amplia variedad de PFNM generados en los ecosistemas, constituyen importantes alternativas económicas, alimentarias, ambientales y culturales para promover la diversificación de las actividades productivas campesinas que contribuyen a la conservación de los recursos naturales (De la Peña, 2001 en Menchaca-García *et al*; 2012). Las orquídeas forman parte de este tipo de productos y los ingresos que genera su aprovechamiento, benefician a la población rural de manera relevante (Ávalos-Romero, 2001 en Menchaca-García *et al*; 2012). En México de acuerdo con la Ley General de Vida Silvestre (LGVS) existen dos categorías para el Manejo de Fauna Silvestre: manejo extensivo (en vida libre), y manejo intensivo (confinamiento o encierro). El medio para llevar a cabo un correcto manejo de Vida Silvestre es a través de la creación de las Unidades de Manejo de Vida Silvestre (UMA). Las Unidades para la Conservación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable de la Vida Silvestre (UMA) son los criaderos

extensivos e intensivos de Fauna Silvestre, los viveros e invernaderos, así como todas las alternativas viables que permitan la propagación de especies y la elaboración de productos y subproductos que puedan ser incorporados al mercado legal de Vida Silvestre (SEMARNAT, 2009). Cabe señalar que la LGVS y el concepto de UMA está enfocadas al aprovechamiento de la fauna sin embargo algunas UMA dedicadas a la conservación de orquídeas son el Vivero Anatolia (Coatepec, Ver.), La Selva (Catemaco, Ver.), Nace el Río (Actopan, Ver.), La Joya de Guadalupe (Atlixco, Pue.) y el vivero La Encantada (Oaxaca, Oax.); las cuales además incluyen la mejora de capacidades humanas para cumplir con sus objetivos (Menchaca-García *et al*;2012).

La comercialización legal de las especies silvestres incluidas en la NOM-059-SEMARNAT-2010 se debe llevar a cabo a partir de individuos procedentes de una unidad de manejo ambiental (UMA), cuyo establecimiento se requiere de la autorización de la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, a través de su Dirección General de Vida Silvestre que certificará, en el caso de las orquídeas, su reproducción y con ello evitar la sobreexplotación de los individuos silvestres (Menchaca-García *et al.*, 2012).

#### **2.4.3 Conservación *ex situ***

La estrategia de conservación *ex situ* tiene dos principales variantes, la propagación y mantenimiento de las especies que ya no pueden subsistir en la naturaleza y otra modalidad que comprende la propagación masiva y subsecuente comercialización de especies, por la mayor cantidad de personas posible, que es de suma importancia ya que reduce y desalienta la colecta de ejemplares en la naturaleza (González-Castellanos, 2014).

Los métodos de conservación *ex situ* implican la recolección de muestras representativas de la variabilidad genética de una especie y su mantenimiento fuera de las condiciones naturales en las que la especie ha evolucionado. Las ventajas que proporcionan estos métodos son control directo sobre el material, fácil accesibilidad y disponibilidad (Reid y Miller, 1989).

Una vez realizada la recolección del material a conservar, la conservación *ex situ* de especies amenazadas consta de dos elementos esenciales: el almacenamiento o preservación del germoplasma y el desarrollo de métodos que posibiliten su propagación (Iriondo-Alegría, 2001). La conservación *ex situ* de germoplasma se basa esencialmente en la utilización de los bancos de germoplasma que son centros orientados al almacenamiento mediante propágulos de una parte representativa de la variabilidad genética correspondiente a una determinada especie. Dentro de esta categoría podemos distinguir los bancos de semillas, los bancos de cultivo *in vitro*, los bancos de polen y los bancos de genes o bancos de ADN (Iriondo-Alegría, 2001).

#### **2.4.3.1 Cultivo *in vitro***

El cultivo de tejidos vegetales ha probado ser una herramienta útil para la multiplicación de especies e híbridos de orquídeas (Arditti y Ernest, 1993 en Menchaca-García *et al.*, 2012), como para su conservación *ex situ*, siendo las semillas el material de propagación adecuado para conservar la diversidad genética de una población (Flores-Escobar *et al.*, 2008). El método ha sido probado con éxito en programas de conservación de especies amenazadas como *Laelia speciosa* (Aguilar-Morales y López-Escanilla, 2013 en Pulido-Flores y Monks, 2013), pero tanto en orquídeas como en otras especies obtenidas por este método, su mayor problemática es una adecuada adaptación a condiciones *ex vitro*.

En la actualidad se tienen protocolos de micropropagación para *Chysis bractescens* Lindl., *Coryanthes picturata* Rchb.f., *Encyclia cordigera* (Kunth) Dressler, *Epidendrum raniferum* Lindl., *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler et W. E.Higging, *Laelia anceps ssp. dawsonii* (J. Anderson) Rolfe, *Lycaste skinneri* Lindl., *Rhyncholaelia digbiana* (Lindl.) Schltr, *Stanhopea oculata* Lindl., *Stanhopea tigrina*

Bateman, *Sobralia macrantha* Lindl., *Vanilla insignis* Ames, *V. planifolia* Andrews, *V. pompona* Schiede, entre otras. Los resultados han sido satisfactorios en cuanto a germinación y aclimatación, excepto para *Prosthechea vitellina* (Lindl.) W.E.Higgins y *Cypripedium irapeanum* La Llave & Lex.; sin embargo, se sigue trabajando con estas especies para lograr su propagación *in vitro*; pues tienen gran potencial como ornamentales y están incluidas en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (Menchaca-García *et al.*, 2012).

Las técnicas de cultivo *in vitro* pueden contribuir a incrementar el porcentaje de germinación. Una de las ventajas de la germinación *in vitro* es que es asimbiótica capaz de reproducir miles de plantas en un medio artificial controlado, el cual se puede modificar de acuerdo a las necesidades particulares de cada especie (Rodríguez-Farfán, 2013), pero a pesar del alto porcentaje de éxito en condiciones de laboratorio, el proceso de adaptación de los ejemplares a condiciones naturales, conocido como aclimatación, es una etapa crítica ya que en este periodo ocurre una pérdida de plantas en gran porcentaje causado por el estrés biótico y abiótico (Kozai, 1991; van Huylendroeck *et al.*, 1998).

#### **2.4.3.2 Aclimatación**

Cha-um *et al.* (2009) afirman que las condiciones en el crecimiento *ex vitro* son diferentes de las utilizadas para el cultivo *in vitro*. La transferencia de plantas a condiciones de invernadero o condiciones *ex vitro* afecta la supervivencia. Las plantas pasarán de un estado heterótrofo a uno autótrofo sufriendo cambios fisiológicos y morfológicos, así como una mayor exposición a plagas y enfermedades y condiciones abióticas adversas (Díaz *et al.*, 2010).

González-Castellanos (2014) menciona que existe una relación entre el tamaño de la plántula y la capacidad de aclimatación. En su estudio sobre *Laelia speciosa* se obtuvo un mayor rango de supervivencia en plántulas de 5 cm (77%) mientras que en aquellas de entre 1 y 2 cm presentaron un 0% de supervivencia.

#### **2.4.3.3 Aclimatación en orquídeas**

Un ejemplo de los cambios fisiológicos y morfológicos es el trabajo de Torres *et al.* (2006) que evaluaron la anatomía de la epidermis de la hoja de *Cattleya jenmanii* Rolfe de multiplicación *in vitro* y aclimatación a un orquideario, se determinó que durante la etapa de aclimatación las hojas de las plantas *in vitro* incrementaron el tamaño de los estomas y el grosor de las paredes anticlinales de las células normales para favorecer la resistencia mecánica y la rigidez.

Pospišilová *et al.* (1999) señalan que la aclimatación *in vitro* es un factor clave en la producción de plántulas sanas antes del trasplante a condiciones *ex vitro*. Díaz *et al.* (2010) mencionan que para una adecuada aclimatación *ex vitro* se necesitan plántulas de calidad obtenidas en condiciones *in vitro*; estudios en plántulas *Phalaenopsis* y *Cattleya* se probó que a mayor desarrollo foliar y radicular se obtiene mayor porcentaje de aclimatación. Trabajos de aclimatación en otras especies de orquídeas como *Laelia speciosa* (Ávila-Díaz *et al.*, 2009) respaldan este aspecto.

Existen diversos trabajos de aclimatación *ex vitro* de orquídeas, pero principalmente enfocados a la evaluación de parámetros morfológicos y comerciales como el tamaño y longitud de la planta o bien atienden a evaluar parámetros como el sustrato para aumentar la supervivencia *ex vitro* como en *Cattleya*, *Phalaenopsis* y *Laelia* (Venturieri y Seidel-Júnior, 2011; Venturieri y Arbieto, 2011 y Díaz *et al.* 2010), omitiendo parámetros fisiológicos como la actividad enzimática peroxidasa o el contenido fenólico por mencionar algunos.

Vidoz *et al.* (2008) destaca que medios suplementados con nutrientes o reguladores de crecimiento en la etapa *in vitro* favorecen la supervivencia de plántulas de orquídeas a condiciones *ex vitro*.

Díaz *et al.* (2010) mencionan que la planta necesita lograr cierto rango de crecimiento en condiciones *in vitro* para soportar las condiciones externas de invernadero, demostrando que la longitud de las raíces representa un umbral crítico de supervivencia *ex vitro* en *Phalaenopsis* y *Cattleya*. En un estudio realizado por Venturieri y Arbieto (2010) se muestra una relación entre la mayor longitud de raíces, mayor el porcentaje de supervivencia en *Phalaenopsis amabilis*.

La biotecnología ha podido fabricar de manera sintética reguladores de crecimiento que pueden imitar el rol de las fitohormonas de manera natural. Los reguladores de crecimiento vegetal, cumplen un papel importante en la regulación de diferentes procesos bioquímicos a nivel celular en los vegetales (Alcantara-Cortes *et al*; 2019). Los reguladores del crecimiento, tales como las auxinas y etileno han sido utilizados para aumentar el porcentaje de enraizamiento al acelerar la iniciación radical, así como incrementar el número y calidad de las raíces durante el estacado de muchas especies frutales (Hartmann y Kester, en Villanueva *et al.*, 1998). Investigaciones han estudiado el efecto de Ácido salicílico (AS) como un regulador de crecimiento que estimula el crecimiento radicular en cultivos como el frijol (Basu *et al.*, 1969) soya (Gutiérrez-Coronado *et al.*, 1998) y tomate (Larqué-Saavedra *et al.*, 2010).

En años recientes el ácido salicílico ha sido el foco de investigación intensiva debido a su función como señalizador endógeno que media las respuestas local y sistémica contra patógenos. También se ha encontrado que el AS juega un papel durante la respuesta de la planta al estrés abiótico tales como sequía, frío, toxicidad por metales pesados, calor o estrés osmótico. Además de esta función durante el estrés biótico y abiótico, el AS desempeña un papel crucial en la regulación de factores fisiológicos y procesos bioquímicos durante toda la vida útil de la planta (Rivas-San Vicente y Plascencia, 2011).

## **2.5 Ácido salicílico (AS)**

El AS es un compuesto fenólico y constituyente natural de las plantas (Mady, 2009), de acuerdo con Raskin (1992), el AS debe incluirse en la categoría de fitohormonas, es una molécula de señalización importante ya que tienen efectos diversos sobre la tolerancia al estrés biótico y abiótico (López-Delgado *et al.*, 2007).

### **2.5.1 El ácido salicílico como molécula de señalización en plantas**

Benavides-Mendoza (2002) menciona que el daño o estrés oxidativo se presenta cuando la producción de especies activas de oxígeno (EAO) rebasa la capacidad de los sistemas antioxidantes de la célula. Normalmente el nivel de EAO es alto cuando la planta se ve sometida a alguna condición de estrés biótico o abiótico.

Aunque la presencia de EAO causa daño por oxidación, las plantas también hacen uso de las EAO en la disipación energética y como señalizadores desencadenantes de respuestas de adaptación y defensa (Draper, 1997 en Benavides-Mendoza, 2002). A su vez estas últimas se asocian con cambios morfológicos y fisiológicos de la planta (Inzé y Van Montagu, 1995 en Benavides-Mendoza, 2002). Es probable que el AS tenga algún papel regulador sobre el balance de la oxidación/reducción de las células vegetales, y ello tal vez explique la capacidad del AS de inducir respuestas tan variadas: fisiológicas, morfogénicas y adaptativas en las plantas. Lo anterior se sigue a partir del comprobado efecto del AS sobre la actividad de catalasa y otras enzimas que controlan el nivel de las EAO (Raskin, 1992 en Benavides-Mendoza, 2002).

### **2.5.2 El AS y la aclimatación**

Larqué-Saavedra *et al.* (2010) demostró que el uso de bajas concentraciones de AS incrementó el crecimiento y desarrollo del vástago y raíz de tomate, además de que describe dos tipos de respuesta de las plantas a la aplicación del AS. La primera se refiere al hecho de que el AS incrementa significativamente el crecimiento radical (Gutiérrez-Coronado *et al.*, 1998 en Larqué-Saavedra *et al.*, 2010), efecto que fue también demostrado utilizando bioensayos de raíces transformadas de *Catharanthus roseus* (Echevarría *et al.*, 2007 en Larqué-Saavedra *et al.*, 2010). La segunda es que concentraciones a nivel de picomoles o femtomoles son suficientes para producir efectos morfofisiológicos significativos con bioensayos especializados (Echevarría *et al.*, 2007, Quiroz-Figueroa *et al.*, 2001 en Larqué-Saavedra *et al.*, 2010).

El AS se ha comprobado que participa en procesos de aclimatación ante varios tipos de estrés; en *Laminaria japonica* indujo tolerancia al incremento de temperaturas (Zhou *et al.*, 2010); mientras que en microplantas de *Solanum tuberosum* indujo tolerancia a bajas temperaturas (Mora-Herrera y López-Delgado, 2006). En *Cicer arietinum* L. Plántulas pretratadas con AS son capaces de adaptarse a un estrés térmico e induce la termotolerancia, esta respuesta a estrés térmico puede estar vinculada directamente a la respuesta coordinada de enzimas antioxidantes como peroxidasa (POX), ascorbato peroxidasa (APOX), catalasa (CAT), etc (Chakraborty y Tongden, 2005).

Se ha demostrado que pretratamientos de ácido salicílico en jitomate, incrementan parámetros como el peso, longitud de tallo y longitud de las raíces, así como un aumento de la actividad fotosintética que inducen una mayor tolerancia al estrés durante la aclimatación (Poot-Poot *et al.*, 2018). En plántulas de trigo se ha reportado que incrementa la longitud, el número de raíces y biomasa total en aplicaciones exógenas (Tucuch-Haas *et al.*, 2015), en semillas tratadas con AS el desarrollo de raíces mostró también un incremento en la longitud (Shakirova *et al.*, 2003). De igual manera se reporta el incremento de la longitud de raíces de raíces en soya con aplicaciones exógenas de ácido salicílico (Gutiérrez-Coronado *et al.*, 1998) y en maíz (Gunes *et al.*, 2007). Resultados similares también se han obtenido en hinojo, *Foeniculum vulgare* Mill. (Askari y Ehsanzadeh, 2015).

De la misma manera en plantas de manzanilla *Matricaria chamomila* L., se han obtenido resultados en el que el AS estimula el crecimiento de hojas y raíz pero que en altas concentraciones produce el efecto contrario (Kováčik *et al.*, 2009).

Se ha sugerido que los efectos promotores del crecimiento del AS pueden estar relacionado con cambios en el estado hormonal (Shakirova *et al.*, 2003; Abreu y Munne-Bosch, 2009) o por mejora de la fotosíntesis, transpiración o conductancia estomática (Stevens *et al.*, 2006).

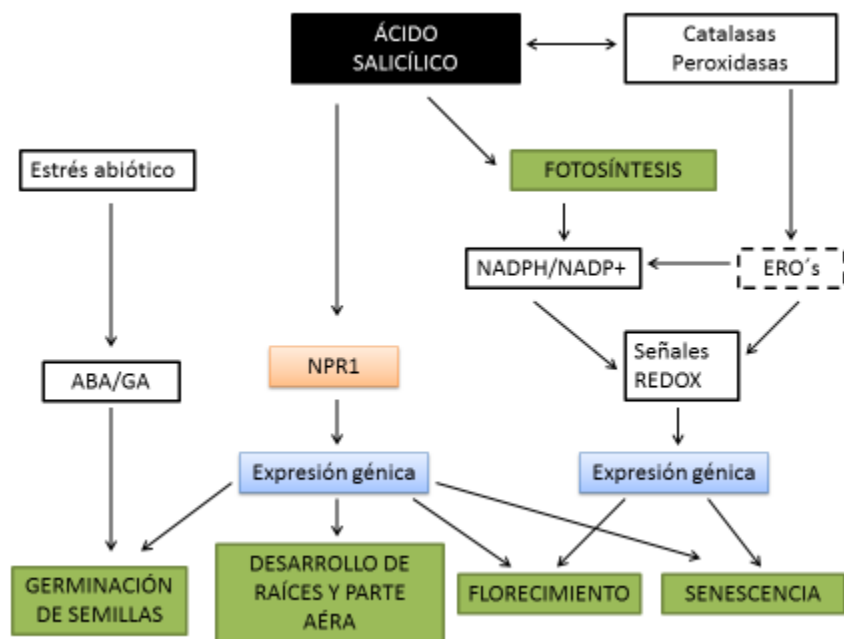
Con estos antecedentes se plantea que el uso de AS durante el desarrollo de raíces en el proceso *in vitro*, puede incrementar la sobrevivencia y adaptación a condiciones *ex vitro*. Por lo que el objetivo es evaluar el efecto del AS en la



aclimatación a condiciones *ex vitro* de tres especies de orquídeas, destacando que no existen trabajos previos sobre el uso del AS en la aclimatación de orquídeas en condiciones *ex vitro*.

### 2.5.3 Importancia de ácido salicílico (AS) en las respuestas de estrés

El AS es una molécula implicada en la regulación y crecimiento de las plantas (Raskin, 1992). Está involucrado además en muchos de los mecanismos de defensa de las plantas bajo condiciones de estrés biótico y abiótico, incluida la resistencia sistémica adquirida (SAR) (Métraux *et al.*, 1990), inducción de síntesis de proteínas (Malamy *et al.*, 1990) y reacción de hipersensibilidad (Horváth *et al.*, 2007). También, está implicada en respuestas antioxidantes, como la síntesis de antioxidantes enzimáticos como las peroxidasas y no enzimáticos como los compuestos fenólicos, (Kováčik *et al.*, 2009) y pigmentos fotosintéticos (Figura 12).



**Figura 12.** Modelo descriptivo de la función del ácido salicílico en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Tomado de Rivas-San Vicente y Plasencia (2011) con algunas modificaciones.

La aplicación exógena de AS a plantas, bajo estrés salino, mejora los procesos de crecimiento y la planta regresa rápidamente a su condición normal (Hayat *et al.*, 2010), como se ha reportado en microplantas de crisantemo donde además hubo un incremento el número y grosor de raíces, como respuesta del AS ante estrés salino (Fuentes-Ayón, 2014), mientras que en *Vigna radiata* se reportó que las aplicaciones de AS generan un incremento en metionina y glicinabetaína, sustancias implicadas en las respuestas de la planta bajo estrés salino (Khan *et al.*, 2014), mientras que en plantas jóvenes de maíz (*Zea mays*) el AS incremento la actividad enzimática de antioxidantes como el ácido hidroxicinámico (Szalai y Janda, 2009).

Existen otros efectos reportados para el AS cuando se aplica a plantas; en *Petunia hybrida* aplicaciones de de 1  $\mu\text{M}$  de AS incrementa en 72% el número de flores por planta (Martín-Mex *et al.*, 2005) y en *Carica papaya* se reporta un incremento de 20% de flores hermafroditas con aplicaciones de 0.01  $\mu\text{M}$  (Martín-Mex *et al.*, 2012).

### III. JUSTIFICACIÓN

México es un país altamente diverso en flora, pero el efecto del cambio de uso de suelo y el tráfico de ejemplares ha puesto numerosas especies en distintas categorías de riesgo como la familia *Orchidaceae*, la cual es altamente demandada y apreciada por sus características ornamentales, sin embargo existen pocos protocolos de propagación *in vitro* como una alternativa de conservación y comercialización de recursos fitogenéticos locales, debido a los retos de investigación y manejo hortícola que demandan.

El Estado de México, en particular la región sur del estado, posee diversos ecosistemas con un registro bien estudiado de la familia *Orchidaceae*, la cual es un recurso fitogenético nativo que necesita ser conservado y a la vez puede ser una fuente de innovación y aprovechamiento en la importante industria florícola local.

El mayor reto del aprovechamiento de los recursos fitogenéticos obtenidos por multiplicación *in vitro* es la aclimatación a condiciones *ex vitro*, donde se presenta un alto porcentaje de mortandad por las condiciones de estrés biótico y abiótico.

Estudios demuestran el uso del ácido salicílico (AS) como una molécula/fitohormona implicada en la inducción de respuestas ante estrés biótico y abiótico.

El presente trabajo tuvo como finalidad evaluar el efecto del AS en la aclimatación *ex vitro* de microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp.

#### IV. HIPÓTESIS

El ácido salicílico es un inductor de respuestas al estrés biótico y abiótico en las plantas, por lo tanto, empleado en condiciones *in vitro* favorecerá la aclimatación y supervivencia *ex vitro* de microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 GENERAL

Evaluar el efecto del ácido salicílico en la aclimatación *ex vitro* de microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp.

### 5.2 ESPECÍFICOS

Seleccionar, multiplicar y estandarizar microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp para escalamiento y mantener una fuente de material biológico .

- 1- Evaluar el efecto del AS en microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp. en la longitud del tallo y de raíz, y peso fresco.
- 2- Evaluar la supervivencia *ex vitro* de microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp. precultivadas en AS.
- 3- Evaluar la actividad enzimática de las peroxidasas en hoja y raíz de microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp. precultivadas en AS.
- 4- Evaluar el contenido de compuestos fenólicos en hoja y raíz de microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp. precultivadas en AS.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Sitio experimental y material biológico

Se utilizaron microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum sp.* y *Encyclia sp.* obtenidas del banco de germoplasma del Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal, del Centro Universitario UAEM Tenancingo, en Tenancingo de Degollado Estado de México, México (Carretera Tenancingo-Villa Guerrero Km. 1.5, en las coordenadas geográficas 18°58'07.3" norte y 99°36'51.1" oeste a 2,053 m).

### 6.2 Descripción del experimento

En este experimento microplantas de *L. autumnalis*, *Epidendrum sp.* y *Encyclia sp.* entre 0.5 a 0.7 cm fueron cultivadas en medio MS + AS en concentraciones 0, 1, 10 y 100  $\mu$ M con 10 microplantas por tratamiento en tres repeticiones (30 microplantas por tratamiento) durante  $120 \pm 4$  días.

Una vez concluido el tiempo bajo condiciones *in vitro* se evaluó la longitud del tallo, longitud de la raíz y el peso fresco de la planta, se cuantificó el contenido fenólico y actividad peroxidasa en hoja y la raíz. Posteriormente las plantas obtenidas se trasplantaron a almácigos y se mantuvieron bajo condiciones en cámaras de crecimiento para su aclimatación *ex vitro*, se evaluó la supervivencia 30 días después (Figura 13).

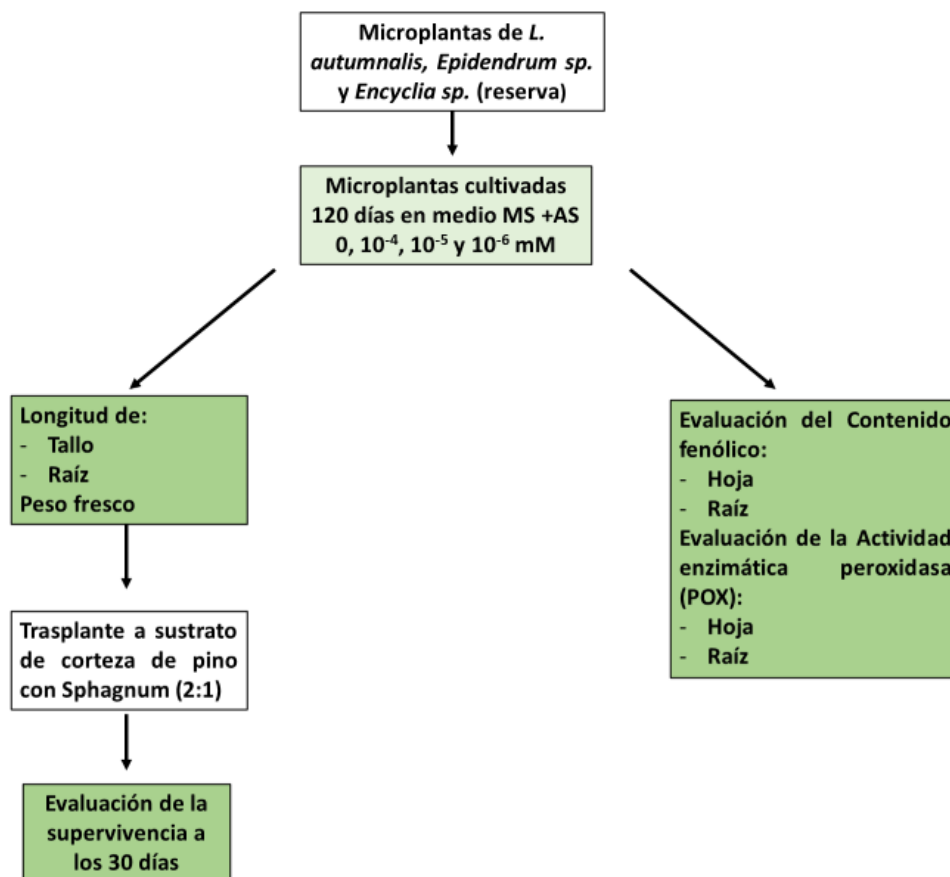


Figura 13. Diagrama general del experimento.

### 6.3 Condiciones de cultivo

Todos los experimentos iniciaron a partir de microplantas cultivadas en medio MS (Murashige y Skoog, 1962, con modificaciones de Espinoza *et al.*, 1986) para mantener una fuente permanente de material biológico.

Los cultivos *in vitro* se mantuvieron en una cámara de incubación a una temperatura de  $20 \pm 1$  °C, con un fotoperiodo de 16 horas y 8 horas de oscuridad con una intensidad lumínica de entre 400-700 nm.

Los cultivos *ex vitro* se realizaron en almácigos con sustrato de corteza de pino y musgo Sphagnum se mantuvieron bajo condiciones en una cámara de crecimiento

a una temperatura de  $21 \pm 2$  °C de día y  $17 \pm 2$  °C de noche con un fotoperiodo de 18 horas y una intensidad lumínica de entre 400-700 nm (Figura 13).

#### 6.4 Medios de cultivo

El medio básico se elaboró con sales inorgánicas (Cuadro 1) del medio Murashige y Skoog (1962) como se describe en Espinoza *et al.*, (1986) (Cuadro 2) adicionando con 10 mL de sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>), 10 mL de inositol, 5 mL de hierro, 1 mL de tiamina, 2 mL de pantotenato de calcio, 0.5 mL de glicina, 1 mL de ácido nicotínico y 30 g de sacarosa.

**Cuadro 1.** Sales del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) MS descrito por Espinoza *et al.*, (1986).

Sustancia	Fórmula	Cantidad para 1000 mL
Nitrato de amonio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	17.5 g
Nitrato de potasio	KNO <sub>3</sub>	20 g
Cloruro de calcio	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	4.5 g
Fosfato de potasio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.75 g
Ácido bórico	H <sub>3</sub> BOP <sub>3</sub>	50 mg (miligramos)
Sulfato de manganeso	Mn SO <sub>4</sub> 4 H <sub>2</sub> O	200 mg
Sulfato de zinc	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	100 mg
Yoduro de potasio	KI	10 mg
Molibdato de sodio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O	2.5 mg
Sulfato cúprico 5.0 mg Cloruro de cobalto 5.0 mg	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.5 mL de la solución preparada.



**Cuadro 2.** Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) MS descrito por Espinoza *et al.*, (1986).

SOLUCIÓN	Para 1000 mL
Sales	100 mL
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> )	10 mL
Inositol	10 mL
Hierro (Fe)	5 mL
Tiamina	1 mL
Pantotenato de calcio	2 mL
Glicina	4 mL
Ácido nicotínico	1 mL
Azúcar	30 g
Agar-Bacteriológico	7.5 g

El medio de cultivo se preparó mezclando las cantidades requeridas de sales inorgánicas y vitaminas, las cuales se tomaron de soluciones concentradas conocidas (Cuadro 3), se aforó y se ajustó el pH entre 5.6 y 5.7 con hidróxido de potasio (KOH), posteriormente se agregó el agar y se disolvió con calor. El AS se agregó al medio de cultivo antes de aforar y medir el pH.

**Cuadro 3.** Soluciones concentradas para el medio de cultivo base MS (Espinoza *et al.*, 1986).

Solución	Fórmula	cantidad	Observaciones.
Sulfato de Magnesio	MgSO <sub>4</sub>	3.7 g en 100 mL de agua destilada.	
Hierro	Na <sub>2</sub> EDTA Sulfato ferroso	→ 0.75 g → 0.55 g	Estos se disuelven en 20 mL de agua destilada cada uno. El EDTA se calienta para disolverse. Después ambos se aforan a 100 mL.
Tiamina		40 mg en 100 mL de agua destilada	
Inositol		1.0 g en 100 mL de agua destilada	
Pantotenato de calcio		100 mg en 100 mL de agua destilada	Congelar. Se recomienda Congelar en porciones pequeñas.
Glicina		25 mg/50 mL de agua destilada.	Disolver con KOH antes de aforar. Se guarda en alícuotas de 5 mL en el congelador
Ácido nicotínico		50 mg/100 mL	Se guarda en alícuotas de 5 mL en el congelador
Ácido salicílico	AS	20mg/50 mL de agua destilada.	Disolver con KOH antes de aforar. Se guarda en alícuotas de 5 mL en el congelador

Se utilizaron frascos de vidrio de 70 mm x 45 mm con tapa plástica traslúcida con 20 mL de medio sellados con película (Kleenpack) para el mantenimiento del material biológico y tubos de vidrio de 25 mm x 150 mm con tapa plástica con 10 mL de medio sellados también con película para los tratamientos.

Los medios de cultivo y materiales para la siembra (cajas Petri, pinzas y bisturí) fueron esterilizados en autoclave de presión a 120 °C durante 15 minutos (Felisa, FE-398 México).

### **6.5 Solución concentrada de ácido salicílico (AS)**

Para todas las concentraciones de AS utilizadas en este trabajo se hizo una solución de 40 mg de AS en 100 mL de agua destilada. El AS se disolvió en 0.5 mL de hidróxido de potasio (KOH) 1 N y posteriormente se aforó con agua destilada a 100 mL.

### **6.6 Incubaciones *in vitro* con ácido salicílico**

Microplantas de *L. autumnalis*, *Epidendrum sp.* y *Encyclia sp.* se sembraron en medio básico (MS) en concentraciones de 0 (testigo), 1, 10 y 100  $\mu$ M de AS cultivándose durante aproximadamente  $120 \pm 4$  días (Figura 13).

### **6.7 Siembra en suelo**

Plantas de *L. autumnalis*, *Epidendrum sp.* y *Encyclia sp.* provenientes de condiciones *in vitro* se enjuagaron perfectamente y se sembraron en almácigos de 20 x 35 mm en recipientes de 15 x 26 cm usando como sustrato, previamente esterilizado de corteza de pino y musgo *Sphagnum* previamente hidratado en una proporción 2:1. Las plantas se regaron dos veces por semana con agua ajustada a un pH entre 5.6 y 5.7 (Figura 13).

#### **6.7.1 Evaluación de la supervivencia**

Una vez concluido el tiempo bajo condiciones *ex vitro* se evaluó la longitud del tallo y raíz, así como el peso fresco de las plántulas obtenidas (Figura 12). Se cuantificaron las plántulas vivas considerando: en *Epidendrum sp.* al menos una hoja en desarrollo, y en *L. autumnalis* y *Encyclia sp.* se consideró que al menos un pseudobulbo permanezca verde. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA Duncan ( $\alpha = 0.05$ ).

## **6.8 Evaluación de la actividad enzimática peroxidasa, y contenido fenólico**

Una vez concluido el tiempo de incubación se evaluaron dos parámetros: actividad enzimática peroxidasa y el contenido de fenoles totales.

### **6.8.1 Cuantificación de la actividad enzimática peroxidasa**

La cuantificación de la actividad de las peroxidasas se realizó siguiendo el método descrito por Anderson *et al.* (1995), en hoja y raíz de las orquídeas en estudio (Figura 13).

#### **Extracción de proteína.**

Para el buffer de extracción (100 mL):

- Se pesaron 340.2 mg de fosfato monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y se aforó a 50 mL con agua destilada.
- Se pesaron 871 mg de fosfato de potasio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) y se aforó a 100 mL con agua destilada.
- Para obtener el pH de la solución, al fosfato monobásico se fue agregando poco a poco el fosfato dibásico hasta ajustar el pH a 7.2.
- Una vez ajustado el pH se toman 100 mL y se agregaron a la solución 37.2 mg de EDTA, 1 gr de polivinil polipirridona.

Se cosechó el tejido de la planta con el buffer de extracción en una proporción de 25 mg/100  $\mu\text{L}$ . La muestra se centrifugó a 10000 rpm por 15 minutos.

#### **Mezcla de reacción:**

Para el buffer de reacción:

- Se pesaron 344 mg de fosfato de sodio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) y se aforó a 50 mL con agua destilada.
- Se pesaron 709.8 mg de fosfato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) y se aforó a 100 mL con agua destilada.
- Para ajustar el pH se inició con el fosfato de sodio monobásico y se agregó poco a poco el fosfato de sodio dibásico hasta ajustar el pH a 7.0.

A 125 mL del buffer de reacción se agregaron 51.25  $\mu\text{L}$  de guaiacol y 56.25  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (al 30 %).

La lectura se hizo a 470 nm en intervalos de 30 segundos en 3 minutos en un espectrofotómetro (Jenway 6405 uv/vis spectrophotometer). El blanco es el buffer con guaiacol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para la reacción son 2.98 mL del buffer con guaiacol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> más 20 µL de la muestra, agitada lo más rápido posible. Los datos fueron analizados por medio de la prueba ANOVA (Duncan ( $p \leq 0.05$ )).

### **6.8.2 Cuantificación del contenido fenólico**

Se realizó bajo el método Folin-Ciocalteu descrito por Waterman y Mole (1994) en hoja y raíz de las orquídeas en estudio (Figura 13).

#### **Extracción de muestra.**

- Se pesaron 0.1 g de muestra y se maceraron en 2.5 mL de etanol al 50%.
- Fueron puestas en baño maría (hirviendo) por 5 minutos.
- Se centrifugaron a 4500 rpm por 5 minutos (las muestras se almacenaron y se mantuvieron en refrigeración).

#### **Cuantificación de Fenoles**

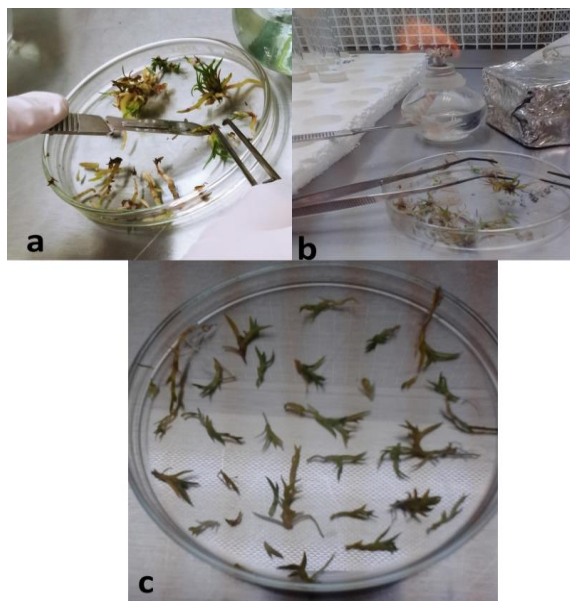
- Se tomaron alícuotas de 200 µL por triplicado.
- Se adicionaron 75 µL de reactivo Folin-Ciocalteu.
- Se adicionaron 2.14 mL de agua destilada.
- Se adicionaron 250 µL de carbonato de sodio al 20% (se adiciona de último ya que se precipita la muestra si se agrega antes) y se dejaron reposar por 30 minutos en oscuridad.

Se realizó la lectura a la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6405 uv/vis spectrophotometer), con cinco repeticiones y seis mediciones de cada tratamiento. Los datos fueron analizados por medio de la prueba ANOVA (Duncan ( $p \leq 0.05$ )).

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Selección, multiplicación y estandarización de microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp.

Partiendo de microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp. obtenidas del Banco de Germoplasma del Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal, del Centro Universitario UAEM Tenancingo; se realizaron tres subcultivos en medio MS, se mantuvieron en una cámara de incubación a una temperatura de  $20 \pm 1$  °C, con un fotoperiodo de 16 horas y una intensidad lumínica de entre 400-700 nm durante 30 días para obtener un material vegetal estandarizado del mismo tamaño y edad (Figura 11). Se obtuvieron microplantas de *L. autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp. entre 5 - 7 mm para su uso en los experimentos descritos en el presente trabajo. Las tres especies no presentaron efectos por acumulación de sales en el medio MS, ya que la concentración de sales del medio ha sido modificada para el crecimiento adecuado de orquídeas, tal y como muestran trabajos en especies como *Laelia* sp. y *Epidendrum* sp. (Flores Hernández *et al.*, 2017) e híbridos de *Phalaenopsis* (Salazar-Mercado *et al.*, 2013).



**Figura 14.** Pág. Op. Selección (a), multiplicación (b) y estandarización (c) de microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp. para su cultivo en condiciones *in vitro*.

## **7.2 Evaluación el efecto del AS en microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp. en la longitud del tallo y de raíz, y peso fresco**

Se evaluó la longitud de tallo, longitud de la raíz y el peso fresco en microplantas de *L. autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp. cultivadas en AS durante 120 días siguiendo la metodología descrita previamente.

### **7.2.1 Evaluación en la longitud del tallo en *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp.**

Se evaluó la longitud de tallo en microplantas de *L. autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp. cultivadas en AS durante 120 días.

En microplantas de *Laelia autumnalis* los tratamientos de AS 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$  inhibieron el crecimiento del tallo en un 34, 13 y 36% respectivamente (Figura 15).

En *Epidendrum* sp., el tratamiento de AS 10  $\mu\text{M}$  mostró una tendencia al incremento del 21% y el tratamiento 100  $\mu\text{M}$  un 16% respecto al control; por el contrario, el tratamiento 1  $\mu\text{M}$  decrementó no significativamente un 7% respecto al control (Figura 15).

En microplantas de *Encyclia* sp. únicamente el tratamiento 10  $\mu\text{M}$  de AS incrementó significativamente la longitud del tallo en un 23% respecto al control. Los tratamientos 1 y 100  $\mu\text{M}$  incrementaron, aunque no significativamente un 16% y 14% respectivamente en comparación al testigo (Figura 15).

El efecto de los tratamientos de AS en el desarrollo de la longitud del tallo en *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp. presenta similitudes en los resultados obtenidos por Gómez-Llaca (2015) en clones de *Manihot esculenta* Crantz; en la cual utilizaron concentraciones iguales de ácido acetilsalicílico (AAS) para la preservación a largo plazo en cultivo *in vitro* de esta especie y en las que también se presentó un incremento en la longitud de los brotes. Laarqué-Saaverdra *et al.* (2010) en su estudio sobre el efecto del AS en plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) demostraron que bajas concentraciones de AS como 1 o 0.1  $\mu\text{M}$  incrementaron

la longitud del tallo. En contraparte Khodary (2004) obtuvo un crecimiento en el tallo de *Zea mays* (L.) con aplicaciones exógenas de AS en alta concentración ( $10^{-2}$  M).

Las diferencias entre el efecto del AS en *L. autumnalis* en relación a las otras especies del estudio puede atribuirse a la diferencia natural en la fisiología de cada especie a pesar de su relación taxonómica, dado que los tres géneros de las orquídeas de este estudio comparten la misma subtribu, *Laeliinae* (van den Berg, 2005).

### **7.2.2 Evaluación en la longitud de raíz en *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp.**

La longitud de la raíz se evaluó en microplantas de *L. autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp. cultivadas en AS durante 120 días.

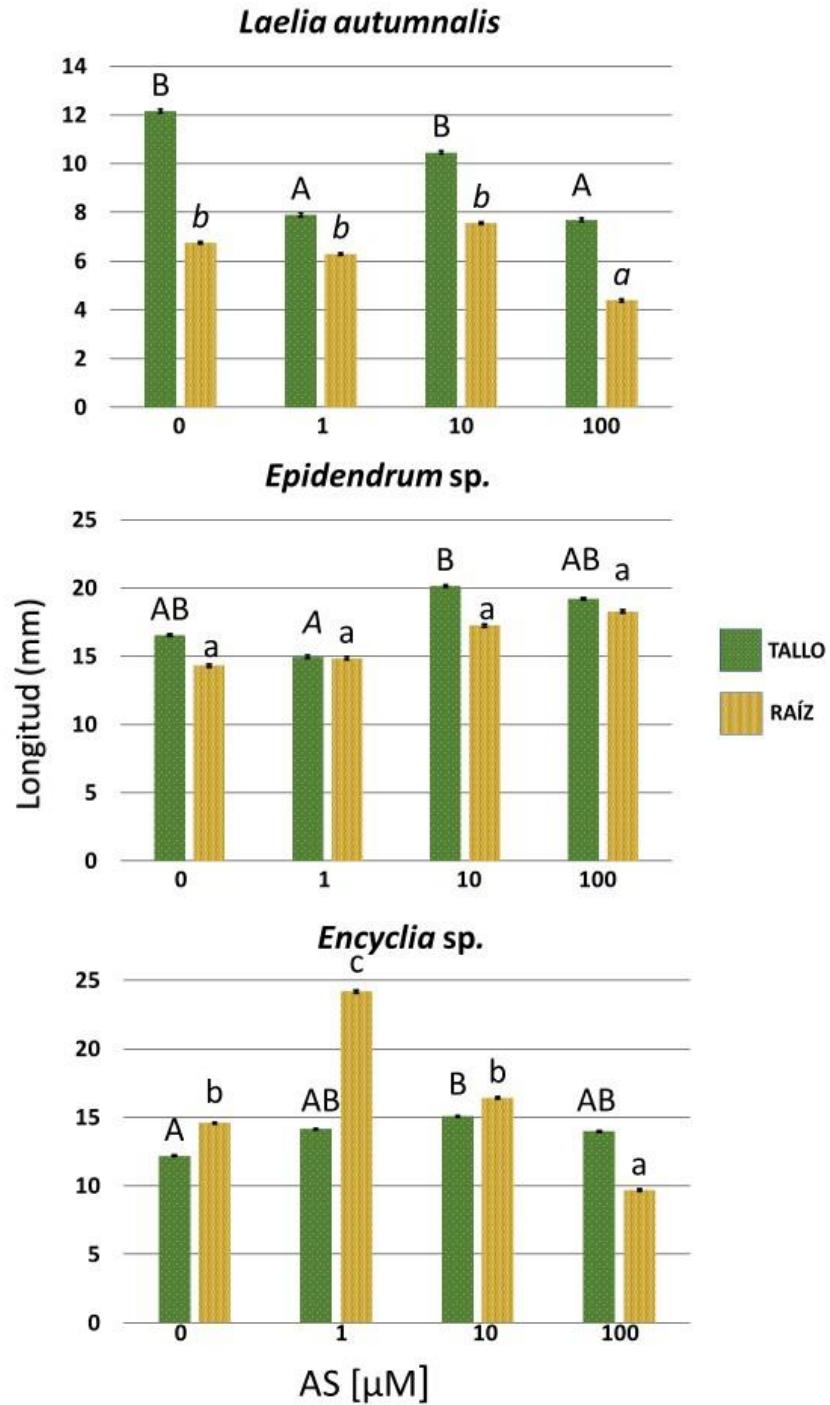
En microplantas de *Laelia autumnalis* el tratamiento de AS 100  $\mu$ M inhibió significativamente la longitud de la raíz en un 39% respecto al control, el tratamiento 1  $\mu$ M, que no presentó diferencias estadísticas, disminuyó en un 6.5%. El tratamiento 10  $\mu$ M mostró un incremento, aunque no significativo del 12% respecto al testigo (Figura 15).

En *Epidendrum* sp. los tratamientos de 1, 10 y 100  $\mu$ M de AS no indujeron cambios significativos en la raíz de las microplantas; sin embargo, se observa una tendencia al incremento de la raíz respecto al control, siendo del 3, 20 y 27% respectivamente (Figura 15).

En microplantas de *Encyclia* sp. el tratamiento 1  $\mu$ M de AS incrementó significativamente la longitud de raíz en un 65%, mientras que el tratamiento 100  $\mu$ M decrementó en un 33% respecto al control. El tratamiento 10  $\mu$ M no mostró cambios significativos, sin embargo, incrementó un 12% respecto al testigo (Figura 15).



Se ha demostrado que bajas concentraciones de AS inducen el crecimiento en raíz en diversos cultivos como el trigo (*Triticum aestivum*) donde bajas concentraciones como 1  $\mu\text{M}$  incrementan la longitud y peso de la raíz (Tucuch-Haas *et al.*, 2015), de igual manera en *Catharanthus roseus* (L.), concentraciones femtomolares de AS incrementaron la longitud de raíces e indujeron el desarrollo de raíces laterales (Echavarría-Machado *et al.*, 2007). De manera contrastante Khodary (2004) reportó un incremento la longitud de las raíces en plántulas de maíz con una concentración elevada de AS, mientras que; Gómez-Llaca (2015) en su mismo estudio sobre el efecto del AAS en clones de yuca reportó una tendencia a inhibir el crecimiento en las concentraciones 100 y 1000  $\mu\text{M}$ .



**Figura 15.** Longitud de tallo y raíz de microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum sp.* y *Encyclia sp.* preincubadas 120 días en AS. Valores con la misma letra son estadísticamente similares, prueba ANOVA Duncan ( $\alpha=0.05$ ). Los datos son expresados por promedios +/- error estándar (n=10) de 3 repeticiones.

### 7.2.3 Evaluación del peso fresco en *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp.

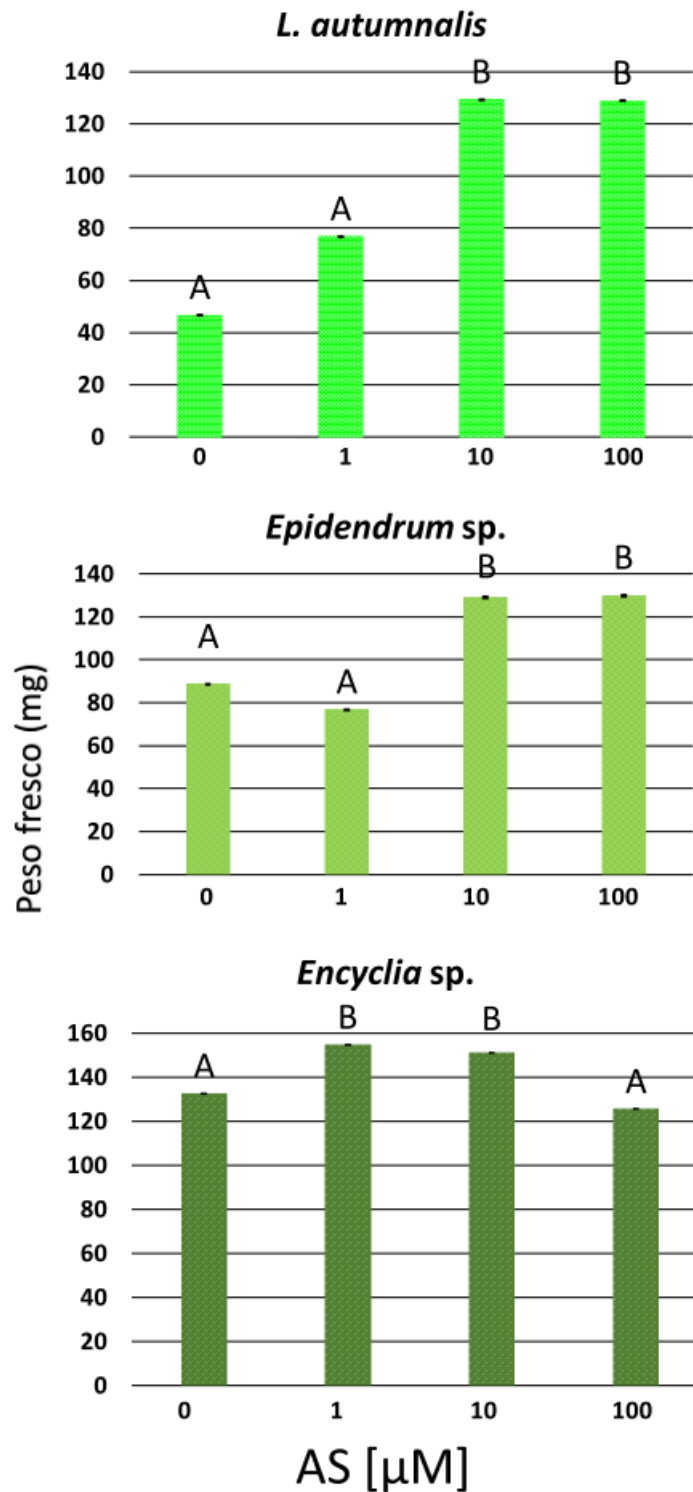
Se evaluó el peso fresco se evaluó en plántulas de *L. autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp. cultivadas en AS durante 120 días.

En microplantas de *Laelia autumnalis* los tratamientos 10 y 100  $\mu\text{M}$  incrementaron significativamente el peso fresco un 87 y 88% respecto al control. El tratamiento 1  $\mu\text{M}$  no mostró diferencias significativas, sin embargo, tuvo un incremento del 25% respecto al testigo (Figura 16).

En microplantas de *Epidendrum* sp. los tratamientos de AS 10 y 100  $\mu\text{M}$  incrementaron significativamente el peso fresco en un 45.9 y 45.4% respectivamente; mientras que el tratamiento 1  $\mu\text{M}$ , presentó un decremento no significativo del 13% respecto al control (Figura 16).

En *Encyclia* sp. los tratamientos de AS 1 y 10  $\mu\text{M}$  incrementaron significativamente el peso fresco de las microplantas en un 16 y 13%; sin embargo, el tratamiento 100  $\mu\text{M}$ , presentó un decremento no significativo del 5% respecto al testigo (Figura 16).

Se han probado los efectos del uso de concentraciones micro o milimolares (incluyendo 1  $\mu\text{M}$ ) de AS para el incremento del peso fresco de plántulas en cultivos como trigo (Tucuch-Haas *et al.*, 2015), tomate (Laarqué-Saaverdra *et al.*, 2010), así como el incremento del peso fresco medido específicamente en raíz de jitomate (Poot-Poot *et al.*, 2018) y yuca (Gómez-Llaca, 2015). De igual manera, Khodary (2004) obtuvo un incremento del peso fresco en tallo y raíz de plántulas de maíz usando una concentración alta de AS ( $10^{-2}$  M).



**Figura 16.** Peso fresco de microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum sp.* y *Encyclia sp.* preincubadas 120 días en AS. Valores con la misma letra son estadísticamente similares, prueba ANOVA Duncan ( $\alpha=0.05$ ). Los datos son expresados por promedios +/- error estándar (n=10) de 3 repeticiones.

### **7.3 Evaluación de la supervivencia *ex vitro* de microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp. precultivadas en AS**

La supervivencia se evaluó en microplantas de *L. autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp. cultivadas en AS durante 120 días, trasplantadas a sustrato e incubadas en condiciones en cámaras de crecimiento para su aclimatación *ex vitro*.

Ningún tratamiento de AS fue letal para el desarrollo de las microplantas de orquídeas de este estudio.

En *L. autumnalis* los tratamientos de AS 1 y 10  $\mu\text{M}$  incrementaron significativamente la supervivencia a condiciones *ex vitro* en un 60 y 110% respectivamente; mientras que el tratamiento 100  $\mu\text{M}$  incrementó, aunque no significativamente un 10% respecto al control (Figura 17).

En *Epidendrum* sp. los tratamientos de AS 1 y 10  $\mu\text{M}$  incrementaron significativamente la supervivencia a condiciones *ex vitro* en un 46 y 69% respectivamente. Contrariamente el tratamiento 100  $\mu\text{M}$  disminuyó la supervivencia en un 23% respecto al testigo (Figura 17).

En *Encyclia* sp. los tratamientos 10 y 100  $\mu\text{M}$  de AS incrementaron significativamente la supervivencia a condiciones *ex vitro* en un 80 y 40% respectivamente (Figura 17); mientras que el tratamiento 1  $\mu\text{M}$  que no mostró diferencias estadísticas, incrementó un 10% respecto al control (Figura 17).

El tratamiento de AS 10  $\mu\text{M}$  indujo un incremento significativo en la supervivencia en las tres especies. Los resultados coinciden con el estudio realizado por Gómez-Llaca (2015) en clones de yuca, donde obtuvo un notable incremento en la supervivencia en bajas concentraciones de AAS (10, 1 y 0.1  $\mu\text{M}$ ) mientras que la supervivencia se vio afectada en altas concentraciones (100 y 1000  $\mu\text{M}$ ) en condiciones de laboratorio y de aclimatación y trasplante a condiciones de vivero y producción. En el mismo estudio se señala que las bajas concentraciones de AS favorecen el vigor y desarrollo de la planta en condiciones de cultivo *in vitro* y aclimatación, como lo ocurrido en *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp.

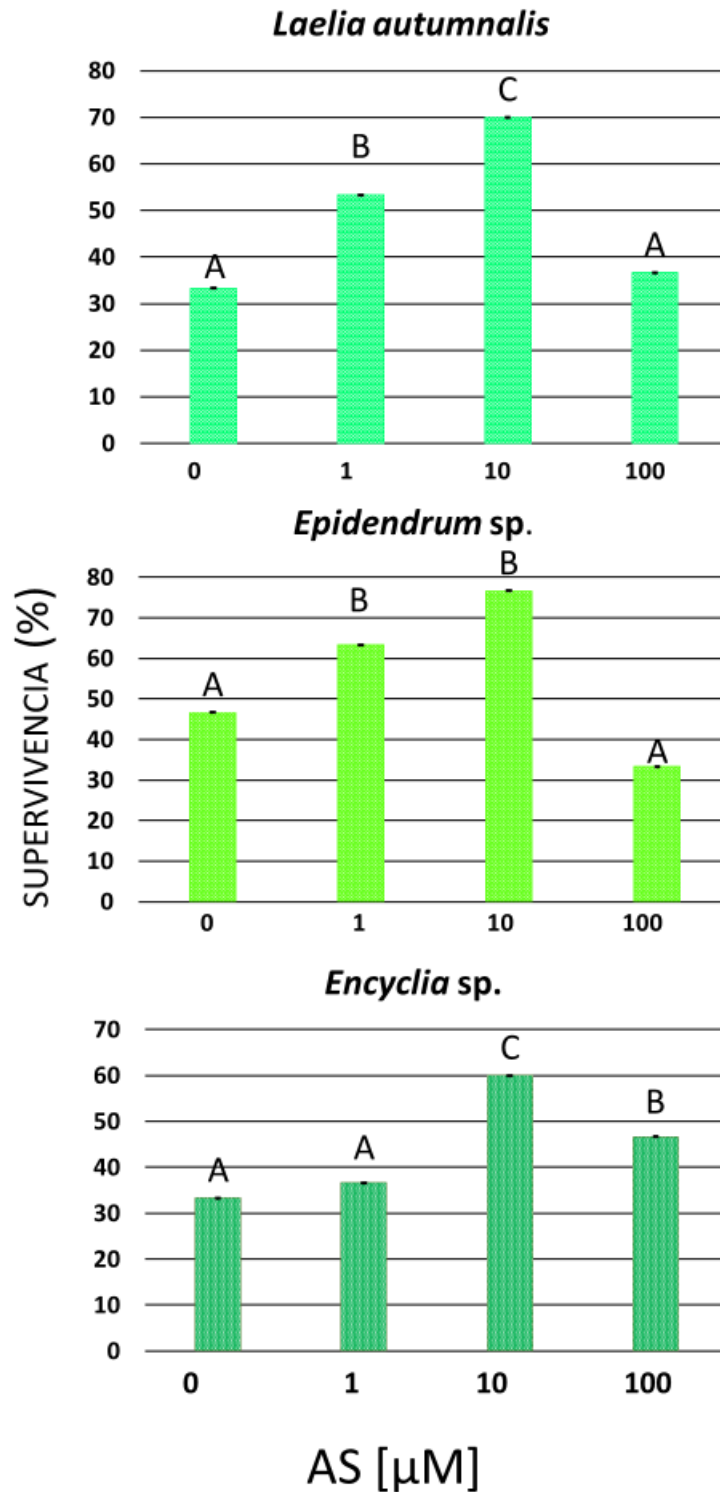
De igual manera se puntualiza que el uso de altas concentraciones de AAS aunque afecten la supervivencia y el crecimiento de las microplantas pueden considerarse para conservación in vitro bajo mínimo crecimiento. Conclusiones similares se obtuvieron en cultivos como *Solanum tuberosum* L. (López-Delgado y Scott, 1997) y *Sechium edule* L. (Alvarenga *et al.*,2007), resultados que coinciden con lo ocurrido en *L. atumnalis*.

De igual manera Gómez-Llaca (2015) hace hincapié que para cada planta deben realizarse ensayos previos para determinar cuál o cuáles son las concentraciones idóneas de AAS (o AS en este caso) para objetivos en particular.

El AS incrementó la supervivencia en las especies del estudio mediante el desarrollo radicular, así como el incremento de biomasa y talla, aspectos tomados en cuenta en la producción comercial de orquídeas y coincidente con estudios previos de aclimatación en orquídeas.

Resultados parciales de este apartado fueron presentados el año 2018, en modalidad cartel en el Primer Congreso Mexicano de Fisiología Vegetal, realizado en el Colegio de Postgraduados campus Montecillo, Texcoco, Estado de México (ver anexo 1) y en el año 2019 en el Segundo Congreso Mexicano de Fisiología Vegetal, realizado en el Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C en Mérida, Yucatán (ver anexo 2).

Igualmente, resultados parciales se han presentado en el marco del Seminario de Agronomía en Floricultura 2020<sup>a</sup> en el Centro Universitario UAEM Tenancingo (ver anexo 3).



**Figura 17.** Supervivencia de microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum sp.* y *Encyclia sp.* preincubadas 120 días en AS y trasplantadas a sustrato por 30 días. Valores con la misma letra son estadísticamente similares, prueba ANOVA Duncan ( $\alpha= 0.05$ ). Los datos son expresados por promedios +/- error estándar (n=10) de 3 repeticiones.

#### **7.4 Evaluación de la actividad enzimática de las peroxidasas en hoja y raíz de microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp.**

Se evaluó la actividad enzimática de las peroxidasas en hoja y raíz de microplantas de *L. autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp. cultivadas en AS durante 120 días siguiendo la metodología previamente descrita.

##### **7.4.1 Evaluación de la actividad enzimática de las peroxidasas en hoja de microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp.**

En *Laelia autumnalis* los tratamientos de AS no mostraron cambios significativos en la actividad enzimática de las peroxidasas. Sin embargo, se observa una tendencia al incremento de la actividad respecto al control, siendo del 9 y 21% en los tratamientos 10 y 100  $\mu\text{M}$  respectivamente. Contrariamente el tratamiento 1  $\mu\text{M}$  disminuyó significativamente la actividad en un 34% respecto al testigo (Figura 18).

En microplantas de *Epidendrum* sp. los tratamientos de AS inhibieron la actividad enzimática de las peroxidasas. El tratamiento 10  $\mu\text{M}$ , disminuyó significativamente la actividad en un 42% en relación al control; mientras que los tratamientos 1 y 100  $\mu\text{M}$ , decrementaron no significativamente en un 25 y 21% respectivamente (Figura 18).

En microplantas de *Encyclia* sp. los tratamientos 1 y 100  $\mu\text{M}$  incrementaron significativamente la actividad enzimática en un 40 y 16% en relación al control. El tratamiento 10  $\mu\text{M}$  no presentó diferencias con el control (Figura 18).

En las especies del estudio se observa claramente una menor actividad enzimática de las peroxidasas en las hojas que en la raíz (Figura 18).

Herrera-Vásquez *et al.* (2015) mencionan que el AS es una molécula con un efecto ambivalente, promoviendo la acumulación de EAO (prooxidante) y por otro lado la inducción de antioxidantes para su eliminación.

Se ha demostrado el efecto del AS en el incremento de la actividad enzimática peroxidasa en cultivos diversos como el trabajo de Fuentes-Ayón (2014) en crisantemo *Dendranthema (Chrysanthemum) grandiflorum*, L. también en el estudio



de Morais-Da Silva *et al.* (2018) en *Vigna unguiculata*, L. e incluso en frutos bajo almacenamiento en condiciones de postcosecha de cerezas, *Prunus avium*, L. (Giménez-Torres, 2015). Chan-Campos (2017) evaluó el efecto del AS en los niveles intra y extracelulares de suspensiones celulares de chile habanero (*Capsicum chinense*, Jacq.) donde los niveles de EAO disminuyeron por la acción del AS.

#### **7.4.2 Evaluación de la actividad enzimática de las peroxidasas en raíz de microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp.**

En microplantas de *Laelia autumnalis* los tratamientos de AS 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$  disminuyeron la actividad enzimática de las peroxidasas de las raíces respecto al testigo siendo del 43, 10 y 33% respectivamente (Figura 18).

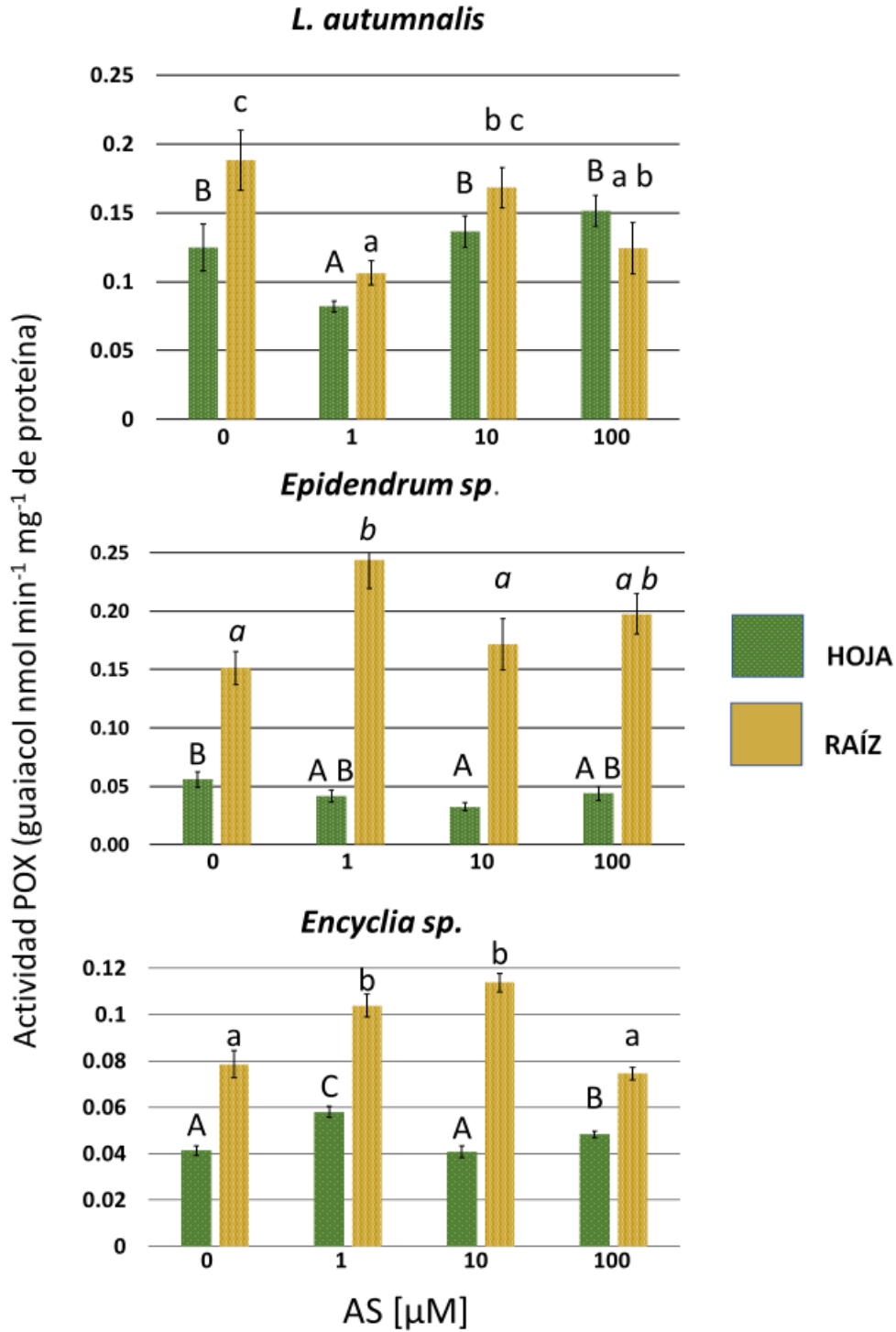
En microplantas de *Epidendrum* sp. el tratamiento de AS 1  $\mu\text{M}$  incrementó significativamente en un 61%; sin embargo, los tratamientos de AS 10 y 100  $\mu\text{M}$ , mostraron una tendencia al incremento en la actividad en un 13 y 30% respecto al testigo (Figura 18).

En *Encyclia* sp. los tratamientos de AS 1 y 10  $\mu\text{M}$  incrementaron significativamente la actividad enzimática de las peroxidasas de las raíces en un 32 y 44% respectivamente. Contrariamente el tratamiento de AS 100  $\mu\text{M}$  disminuyó la actividad enzimática sin diferencia significativa en un 5% respecto al testigo (Figura 18).

En las tres especies se observa una mayor actividad enzimática de las peroxidasas en las raíces (Figura 18) lo que puede ser atribuido a la particular morfología de las raíces de especies epífitas de la familia *Orchidaceae*, las cuales realizan funciones como la absorción de agua e intercambio de gases, así como la fotosíntesis (Téllez-Velasco *et al.*, 2011b).

Se ha probado que el AS incrementa los niveles de la actividad peroxidasa extracelular en raíces de trigo (Minibayeva *et al.*, 2003) como mecanismo de defensa y restauración ante daño físico. Se ha comprobado la relación entre los

niveles de AS y el incremento de la actividad enzimática de las peroxidasas en las raíces de maíz como mecanismo de defensa a patógenos (Mika *et al.*, 2009); así como en plántulas de frijol (Campos *et al.*, 2004). También en semillas de *Phaseolus radiatus* L. tratadas con AS se promovió el desarrollo de raíces adventicias vía acumulación de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Yang *et al.*, 2013).



**Figura 18.** Actividad enzimática de las peroxidasa en microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum sp.* y *Encyclia sp.* preincubadas 120 días en AS. Valores con la misma letra son estadísticamente similares, prueba ANOVA Duncan ( $\alpha= 0.05$ ). Los datos son expresados por promedios +/- error estándar (n=6) de 4 repeticiones.

## **7. 5 Evaluación del contenido de compuestos fenólicos en hoja y raíz de microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp. precultivadas en AS**

Se evaluó el contenido de compuestos fenólicos en hoja y raíz de microplantas de *L. autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp. cultivadas en AS durante 120 días siguiendo la metodología descrita previamente.

### **7.5.1 Evaluación del contenido de compuestos fenólicos en hoja de microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp. precultivadas en AS**

En microplantas de *Laelia autumnalis* el tratamiento de AS 100  $\mu$ M disminuyó significativamente el contenido fenólico de las hojas en un 38%; mientras que el tratamiento 1  $\mu$ M, disminuyó, aunque no significativamente en un 9 %. Únicamente el tratamiento 10  $\mu$ M mostró un incremento no significativo del 6% en el contenido fenólico respecto al control (Figura 19).

En *Epidendrum* sp. las concentraciones 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M incrementaron significativamente el contenido fenólico en un 49 y 67% respectivamente; mientras que el tratamiento 100  $\mu$ M, incrementó no significativamente un 14% respecto a su control (Figura 19).

En microplantas de *Encyclia* sp. los tratamientos de AS 1, 10 y 100  $\mu$ M incrementaron significativamente el contenido fenólico en un 31, 34 y 46% respectivamente (Figura 19).

En las tres especies el tratamiento 10  $\mu$ M presentó un incremento en el contenido fenólico de las hojas (Figura 19).

Existen números estudios que comprueban el efecto del AS en el contenido fenólico de las plantas. Kovácik *et al.* (2009) en *Matricaria chamomilla* L. el AS adicionado a la solución nutritiva para el cultivo en hidroponía mostró que bajas concentraciones de AS (50  $\mu$ M) son promotoras del crecimiento de la planta mientras que altas concentraciones (250  $\mu$ M) inhiben el crecimiento.

En este estudio para evaluar el efecto del AS en el metabolismo de los fenoles en la planta se midió la actividad de la Fenilalanina amoniaco-liasa (PAL, por sus siglas en inglés), responsable de la síntesis de compuestos fenólicos, la cual tuvo un incremento inicial en las hojas de las plantas tratadas con AS respecto al control pero dicha actividad decrementó con el tiempo del experimento, mientras que la actividad de la PAL en las raíces fue estadísticamente mayor en los tratamientos de AS a lo largo del experimento con una notable reducción de la actividad tanto en los tratamientos como en control a lo largo del tiempo. Esto coincide con los bajos valores del contenido fenólico en hoja y raíz *Laelia autumnalis*, así como en las raíces de *Enclyclia* sp. dada la larga exposición al AS en condiciones de cultivo *in vitro*.

En el mismo estudio el contenido de fenoles solubles en las hojas mostró una tendencia al incremento respecto al control mientras que en las raíces los tratamientos de AS mostraron un notable incremento respecto al control. Resultados similares se obtuvieron en las tres especies de orquídeas de este estudio.

Neelam *et al.* (2014) evaluaron el efecto del AS en *Catharanthus roseus*, el cual incrementó el contenido de fenoles, con una mayor concentración en la parte apical que en las raíces, el contenido alcaloides, clorofila y lignina, donde esta última es más abundante en las raíces. La actividad PAL, actividad de la catalasa (CAT) y peroxidasa (POX) mostraron ser mayores en las raíces respecto a las hojas incluso en el control, de igual manera esta actividad se vió incrementada por efecto del AS.

Resultados similares se obtuvieron en cultivo de tejidos de *Salvia miltiorrhiza* donde las concentraciones de AS incrementaron el peso seco, la actividad de la PAL y de y el contenido de fenoles como el ácido cafeico y ácido salvianólico (Dong *et al.*, 2010), de igual manera para medir el efecto del AS en el metabolismo de los fenoles, se midió la actividad PAL y la actividad de la Tirosina aminotransferasa (TAL). Concluyeron que el contenido fenólico fue modificado por el efecto del AS en los fenoles sintetizados vía PAL ya que la actividad TAL en cambio decrementó respecto al control.

En cultivos como maíz concentraciones de AS incrementaron el contenido de fenoles en granos provenientes de plántulas asperjadas previamente con AS, particularmente la concentración 1  $\mu\text{M}$  (Tucuch-Hass *et al.*,2017).

En *Simarouba glauca* se comprobó el efecto del AS en el incremento del contenido de polifenoles, flavonoides, alcaloides y taninos (Awate y Gaikwad, 2014) bajo condiciones de estrés salino. En hojas de naranja agria *Citrus aurantium* L. de igual manera aplicaciones milimolares de AS incrementaron el contenido de fenoles y flavonoides totales, así como el contenido de aceites esenciales (Sarrou *et al.*, 2015).

#### **7.5.2 Evaluación del contenido de compuestos fenólicos en raíz de microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp. precultivadas en AS**

En *Laelia autumnalis* los tratamientos de AS 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$  disminuyeron significativamente el contenido fenólico de las raíces en un 13, 41 y 27% respectivamente (Figura 19).

En microplantas de *Epidendrum* sp. el tratamiento de AS 1  $\mu\text{M}$  incrementó significativamente el contenido fenólico de las raíces en un 20%; mientras que los tratamientos 10 y 100  $\mu\text{M}$  disminuyeron significativamente en un 28 y 10% respecto al control (Figura 19).

En *Encyclia* sp. los tratamientos de AS 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$  disminuyeron significativamente el contenido fenólico de las raíces en un 11, 48 y 17% respectivamente (Figura 19).

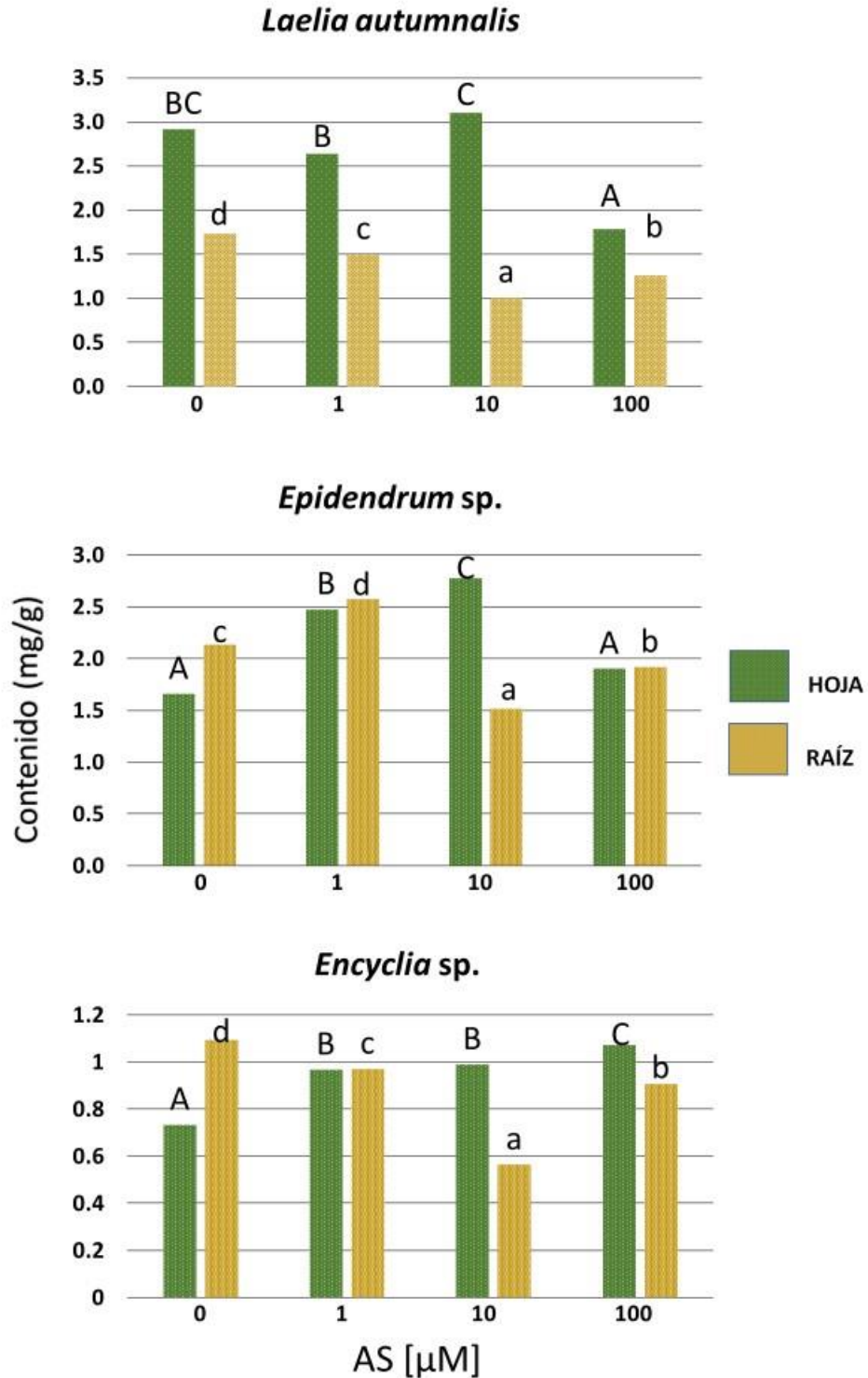
En las tres especies tratamiento 10  $\mu\text{M}$  presentó un decremento significativo en el contenido fenólico en relación a su respectivo control. En *Laelia autumnalis* decrementó un 41%, en *Epidendrum* sp. decrementó un 28% mientras que el *Encyclia* sp. decrementó un 48% (Figura 19).

Jain y Srivastava (1984) mostraron que el AS y otros ácidos fenólicos incrementan el contenido de antocianinas en raíces de maíz, así como aminoácidos precursores como la fenilalanina, mientras que aminoácidos como la tirosina fueron inhibidos; infiriendo la relación entre los niveles de fenoles y la síntesis de antocianinas. Los autores no proponen una respuesta, pero como sugieren los estudios previos, esta síntesis puede estar relacionada posiblemente con la vía metabólica PAL.

García *et al.* (2003) reportan que las bases de algunos mecanismos de resistencia se deben al alto contenido de fenoles que se encuentran enlazados con los carbohidratos de la pared celular, además de limitar la entrada de insectos y de disminuir la disponibilidad de nutrimentos.

Deben realizarse estudios a mayor profundidad como medir la actividad enzimática PAL entre otras para correlacionar si el AS modifica el contenido fenólico en orquídeas por la misma ruta metabólica. De igual manera hay que hacer estudios si el AS induce la síntesis de fenoles específicos como el ácido cafeico o salvianólico o si existe preferencia hacia un fenol en particular, tal como Tucuch-Hass *et al.* (2017). proponen identificar en maíz.

En orquídeas epífitas como las especies de este estudio, la raíz es la estructura más importante dadas las múltiples funciones que realiza por lo que, al inducir mecanismos de desarrollo y protección en éstas, como el incremento del contenido de peroxidasas y fenoles conllevó a una mejor aclimatación que impactó en la supervivencia (Figura 14).



**Figura 19.** Contenido fenólico en hoja y raíz en microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum sp.* y *Encyclia sp.* preincubadas 120 días en AS. Valores con la misma letra son estadísticamente similares, prueba ANOVA Duncan ( $\alpha = 0.05$ ). Los datos son expresados por promedios  $\pm$  error estándar (n=) de 4 repeticiones.



## VIII. CONCLUSIONES

Las microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp. tratadas con AS mostraron un incremento en la biomasa y el incremento de la supervivencia. El tratamiento 10  $\mu$ M presentó los mayores valores en las tres especies

Queda remarcada la importancia no sólo morfológica sino también fisiológica (como muestra la actividad enzimática peroxidasa y el contenido fenólico) de las raíces en orquídeas epífitas y que, al promover su desarrollo, favorece la aclimatación y, por lo tanto, en la supervivencia.

A pesar de la cercanía filogenética hubo varias respuestas diferenciadas. Si bien las microplantas de *L. autumnalis* tratadas con AS inhibieron la longitud de tallo y raíz respecto al testigo esto también puede ser usado en favor de conservar el germoplasma a largo plazo bajo condiciones de mínimo crecimiento. De igual manera estudios con un propósito similar deben realizarse en *Epidendrum*, *Encyclia* y otros géneros y especies nativas de la familia *Orchidaceae*.

Queda probado el uso del AS en favor de la conservación de recursos fitogenéticos nativos y que también puedan tener una aplicación en la importante industria agrícola florícola.

Como propuesta para futuros trabajos e investigaciones, para establecer una relación entre el AS y el contenido fenólico en las tres especies de orquídeas, se deben realizar estudios complementarios como la evaluación de la actividad enzimática PAL y TAL, además de hacer estudios para identificar el tipo de fenoles (como el ácido cafeico o el ácido salvianólico) que priorizan para su síntesis en éstas y otras especies de orquídeas.

## IX. REFERENCIAS

- Abreu, M. E., & Munne-Bosch, S. (2009). Salicylic acid deficiency in NahG transgenic lines and sid2 mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 60(4), 1261-1271. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern363>
- Aguilar-Morales, M.A. y López-Escamilla, A.L. 2013. Germinación *in vitro* de *Laelia speciosa*(Kunth) Schltr., una herramienta para su conservación *ex situ*. In: Pulido-Flores, G., & Monks, S. (2013). *Estudios Científicos En El Estado de Hidalgo y Zonas Aledañas, Volumen II*. Zea Books. P 18-24
- Alcantara Cortes, J. S., Acero Godoy, J., Alcántara Cortés, J. D., & Sánchez Mora, R. M. (2019). *Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal*. Universidad Francisco de Paula Santander. Av Gran Colombia # 12 E – 96 Barrio Colsag. Cúcuta, Colombia. Enfermera. *Magister en Enfermería*. *Nova*, 17(32), 109-129. <https://doi.org/10.22490/24629448.3639>
- Alvarenga Venutolo, S., Abdelnour Esquivel, A., & Villalobos Aránbula, V. (2007). Conservación *in vitro* de chayote (*Sechium Edule*). *Agronomía Mesoamericana*, 18(1), 65. <https://doi.org/10.15517/am.v18i1.5037>
- Anderson, M. D., Prasad, T. K., & Stewart, C. R. (1995). Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant physiology*, 109(4), 1247-1257. [doi.org/10.1104/pp.109.4.1247](https://doi.org/10.1104/pp.109.4.1247)
- Askari, E., & Ehsanzadeh, P. (2015). Effectiveness of exogenous salicylic acid on root and shoot growth attributes, productivity, and water use efficiency of water-deprived fennel genotypes. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 56(5), 687-696. <https://doi.org/10.1007/s13580-015-0038-9>

- Ávila-Díaz, I., Oyama, K., Gómez-Alonso, C., & Salgado-Garciglia, R. (2009). *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 99(3), 335-343. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9609-8>
- Awate, P.D & Gaidwad, D.K. (2014). Influence of Growth Regulators on Secondary Metabolites of Medicinally Important Oil Yielding Plant *Simarouba glauca* DC. under Water Stress Conditions. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 10 (1), 222-229.
- Ayuso, J.B. (2017). Estudio de las Orquídeas silvestres del sistema Ibérico. Tesis de Doctorado. Universidad de la Rioja. [Consultado el 2020, Sep. 18]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/320508516\\_Los\\_frutos\\_y\\_las\\_semillas\\_de\\_las\\_orquideas](https://www.researchgate.net/publication/320508516_Los_frutos_y_las_semillas_de_las_orquideas)
- Basu, R. N., Bose, T. K., Roy, B. N., & Mukhopadhyay, A. (1969). Auxin Synergists in Rooting of Cuttings. *Physiologia Plantarum*, 22(4), 649-652. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1969.tb07419.x>
- Bellone, R. (2006). *ORQUÍDEAS. GUÍA DEL AFICIONADO (Guías del naturalista-Orquídeas)*. Omega.
- Benavides Mendoza, A. (2002). *El ácido salicílico es un agente señalizador y promotor de resistencia biótica y abiótica en las plantas*. Ensayo. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. [Consultado el 25 de octubre de 2020] Disponible en: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Salicilicoeagentese%C3%B1alresitenciaplantas.pdf>
- van den Berg, C. 2005. Laeliinae. In A. Pridgeon, P. Cribb, C. Mark & F. Rammunssen. (eds.). *Genera Orchidacearum 4. Epidendroideae (Part. One)*. Oxford University, Oxford, Reino Unido.

- Bermeo, C.C.A. y Sari, C.F.A. (2018). *Simbiosis hongo-micorriza como factor promotor en la germinación en semillas de orquídeas del género Epidendrum*. Tesis de licenciatura. Universidad de Cuenca, Facultad de ciencias químicas. Cuenca, Ecuador.
- Campos, D.A; Ferrerira, A.; Hampe, M.; Brancão, N.; Silveira, E.; Osório, V. & Agustin, E. (2004) Peroxidase and polyphenol oxidase activity in bean anthracnose resistance. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39(7), 637-643.
- Ceballos G; Rurik. L; Garduño G; López R; Muñoz-Cano M. J; Collado E. y San Román J.E. (2009). *La Diversidad Biológica del Estado de México*. Gobierno del Estado de México y Comisión para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad
- Chakraborty, U., & Tongden, C. (2005). Evaluation of heat acclimation and salicylic acid treatments as potent inducers of thermotolerance in *Cicer arietinum* L. *Current Science*, 89(2), 384-389. [Cited in October 26, 2020]. Disponible en: <http://www.jstor.org/stable/24110588>
- Cha-um, S., Puthea, O., & Kirdmanee, C. (2009). An effective in-vitro acclimatization using uniconazole treatments and ex-vitro adaptation of *Phalaenopsis* orchid. *Scientia Horticulturae*, 121(4), 468-473. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.02.027>
- Chan-Campos, J.M. (2017). *Evaluación del efecto del ácido salicílico en los niveles intra y extracelulares de peróxido de hidrógeno en las suspensiones celulares de C. chinense Jacq.* Tesis de maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. Mérida, Yucatán, México.
- Chase, M.W.; Cameron, K.M.; Barrett, R.L.; Freudstein, J.V. (2003). DNA data and orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: Dixon, K.W.; Kell, S.P.; Barrett, R.L. & Cribb, P.J. (eds.). (2003). *Orchid conservation*. Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu, Sabah. P. 69-89

- Díaz, L.P; Namur, J.J; Bollati, S.A y Arce, O.E. (2010). Acclimatization of Phalaenopsis and Cattleya obtained by micropropagation. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(2), 27-40.
- Dong, J., Wan, G., & Liang, Z. (2010). Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. *Journal of Biotechnology*, 148(2-3), 99-104.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.05.009>
- Dressler, R.L. (1981). *The Orchids: natural history and classification*. Harvard University Press.
- Dressler, R.L. (1993). *Phylogeny and classification of the orchid family*. Dioscorides Press, Portland, Oregon.
- Echevarría-Machado, I., Escobedo-G.M., R. M., & Larqué-Saavedra, A. (2007). Responses of transformed *Catharanthus roseus* roots to femtomolar concentrations of salicylic acid. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(6-7), 501-507. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.04.003>
- Echeverri S., A.P, Jaramillo E., J.R y Villegas V., F (Eds.). (2001). *Manual de cultivo de Orquídeas*. Sociedad Colombiana de Orquideología.
- Emeterio L., A. (2014). *Aprovechamiento de las orquídeas silvestres del sur del Estado de México*. Tesis de maestría en Ciencias. Universidad Autónoma del Estado de México. Centro Universitario UAEM Tenancingo.
- Emeterio-Lara, A.; Palma-Linares, V.; Vázquez-García, L. M. y Mejía-Carranza, J. (2016). Usos y comercialización de orquídeas silvestres en la región sur del Estado de México. *Polibotánica*, (42), 197-214.  
<https://doi.org/10.18387/polibotanica.42.10>

Espinoza, N.O., Estrada, R., Silva-Rodríguez, D., Tovar, P., Lizarraga, R., & Dodds, J.H. (1986). The potato: a model crop plant for tissue culture. *Outlook on agricultura*, 15, 21-26.

Food and Agriculture Organization of United Nations. (2005). *Evaluación de los Recursos Forestales Mundiales 2005. Hacia la ordenación forestal sostenible*. FAO. [Consultado el 2020, Sep 18]. Disponible en <http://www.fao.org/3/a-a0400s.pdf>

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 Horticultura*, XIV (3), 347-353. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2007.02.009>

Flores Hernández, L. A., Robledo-Paz, A., & Jimarez-Montiel, M. J. (2017). Medio de cultivo y sustitutos del agar en el crecimiento *in vitro* de orquídeas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(6), 1315-1328. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i6.297>

Fuentes-Ayón J.M. (2014). *Efecto del ácido salicílico en la tolerancia a estrés salino en microplantas de crisantemo (Dendranthema grandiflora Tzvelev) variedad POLARIS WHITE*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México. Centro Universitario UAEM Tenancingo.

García-Mendoza, A. J., Díaz, M., Briones-Salas, M., y de Jesús Ordóñez Díaz, M. (2004). *Biodiversidad de Oaxaca*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo Oaxaqueño para la conservación de la naturaleza, World Wildlife Fund. México.

García L. S., A. J. Burt, J. A. Serratos, D. M. Díaz P., J. T. Arnason y D. J. Bergvinson (2003) Defensas naturales en el grano de maíz al ataque de *Sitophilus zeamais* (Motsch, Coleoptera: Curculionidae): mecanismos y bases de la resistencia. *Revista de Educación Bioquímica (Reb, México)* 22, 138-145.

- Giménez-Torres, M.J. (2015). Efecto de la aplicación pre-cosecha de ácido salicílico, acetil salicílico y salicilato de metilo en los parámetros de calidad de cerezas en la recolección y durante el almacenamiento post-recolección. Tesis de Doctorado. Universidad Miguel Hernández. Elche, España.
- Gómez-Llaca J.A. (2015). *Uso del ácido acetilsalicílico en la conservación in vitro bajo mínimo crecimiento de dos clones de Yuca (Manihot esculenta Crantz) y determinación de su viabilidad.* Tesis de maestría en Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía.
- González-Castellanos, L.A. (2014). *Propagación in vitro de Laelia speciosa (Orchidaceae) nativa de Aguascalientes.* Tesis para obtener el grado de maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Gunes, A., Inal, A., Alpaslan, M., Eraslan, F., Bagci, E. G., & Cicek, N. (2007). Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *Journal of Plant Physiology*, 164(6), 728-736. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.12.009>
- Gutiérrez-Coronado, M. A., Trejo-López, C., & Larqué-Saavedra, A. (1998). Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36(8), 563-565. [https://doi.org/10.1016/s0981-9428\(98\)80003-x](https://doi.org/10.1016/s0981-9428(98)80003-x)
- Hágsater E.; M. A Soto Arenas; G. A. Salazar Chávez; R. Jiménez Machorro, M. A. López Rosas y R. L. Dressler. (2005). *Las orquídeas de México.* Instituto Chinoín. Productos Farmacéuticos S.A de C.V. México.
- Halbinger, F., Soto, M., & Hágsater, E. (1997). *Laelias of Mexico.* Revista del Herbario AMO.

- Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M., & Ahmad, A. (2010). Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany*, 68(1), 14-25. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.08.005>
- Herrera-Vásquez, A., Salinas, P., & Holuigue, L. (2015). Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1-9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00171>
- Horváth, E., Szalai, G., & Janda, T. (2007). Induction of Abiotic Stress Tolerance by Salicylic Acid Signaling. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26(3), 290-300. <https://doi.org/10.1007/s00344-007-9017-4>
- van Huylenbroeck, J. M., Piqueras, A., & Debergh, P. C. (1998). Photosynthesis and carbon metabolism in leaves formed prior and during ex vitro acclimatization of micropropagated plants. *Plant Science*, 134(1), 21-30. [https://doi.org/10.1016/s0168-9452\(98\)00043-0](https://doi.org/10.1016/s0168-9452(98)00043-0)
- Iriondo-Alegría, J.M. (2001). Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. *Investigación Agraria. Producción y Protección Vegetal*. 16 (1), 6-24
- Jain, A. & Srivastava, H.S. (1984). Effect of Phenolic Acids on Anthocyanin Content in Maize Roots. *Biologia Plantarum* 26 (4), 241-245
- Khan, M. I. R., Asgher, M., & Khan, N. A. (2014). Alleviation of salt-induced photosynthesis and growth inhibition by salicylic acid involves glycinebetaine and ethylene in mungbean (*Vigna radiata* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 67-74. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.03.026>



- Khodary, S. E. A. (2004). Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt stressed maize plants. *International Journal of Agriculture and Biology* (6), 5-8.
- Kováčik, J., Grúz, J. ř., Bačkor, M., Strnad, M., & Repčák, M. (2009). Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. *Plant Cell Reports*, 28(1), 135-143. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0627-5>
- Kozai, T. (1991) Autotrophic Micropropagation. In: Bajaj Y.P.S. (eds) High-Tech and Micropropagation I. Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol 17. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-76415-8\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-642-76415-8_18)
- Kuang, J.C. y L. González V. 1993. Introducción al cultivo y manejo de las orquídeas. Inst. Nac. de Aprendizaje. Dirección de Docencia. Fitotecnia. San José, Costa Rica.
- Larqué-Saavedra, A., Martín-Mex, R., Nexticapan-Garcéz, Á., Vergara-Yoisura, S., & Gutiérrez-Rendón, M. (2010). Effect of salicilic acido on the grwoth tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, XVI (3), 183-187. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2010.16.023>
- Lopez-Delgado, H. A., Scott, I. M., y Mora-Herrera, M. E. (2007). Stress and Antistress Effects of Salicylic Acid and Acetyl Salicylic Acid on Potato Culture Technology. *Salicylic Acid: A Plant Hormone*, 163-195. [https://doi.org/10.1007/1-4020-5184-0\\_7](https://doi.org/10.1007/1-4020-5184-0_7)
- Lopez-Delgado, H., & Scott, I. M. (1997). Induction of in vitro tuberization of potato microplants by acetylsalicylic acid. *Journal of Plant Physiology*, 151(1), 74-78. [https://doi.org/10.1016/s0176-1617\(97\)80039-9](https://doi.org/10.1016/s0176-1617(97)80039-9)
- Mady, M. (2009). EFFECT OF FOLIAR APPLICATION WITH SALICYLIC ACID AND VITAMIN E ON GROWTH AND PRODUCTIVITY OF TOMATO

(*Lycopersicon esculentum*, Mill.) PLANT. *Journal of Plant Production*, 34(6), 6715-6726. <https://doi.org/10.21608/jpp.2009.118654>

Malamy, J., Carr, J. P., Klessig, D. F., & Raskin, I. (1990). Salicylic Acid: A Likely Endogenous Signal in the Resistance Response of Tobacco to Viral Infection. *Science*, 250 (4983), 1002-1004. <https://doi.org/10.1126/science.250.4983.1002>

Martín-Mex, R., Villanueva-Couoh, E., Herrera-Campos, T., & Larqué-Saavedra, A. (2005). Positive effect of salicylates on the flowering of African violet. *Scientia Horticulturae*, 103(4), 499-502. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2004.06.020>

Martin-Mex, R., Nexticapan-Garcéz, A.´., Herrera-Tuz, R.´., Vergara-Yoisura, S., & Larqué-Saavedra, A. (2012). Efecto positivo de aplicaciones de ácido salicílico en la productividad de papaya (*Carica papaya*). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(8), 1637-1643. <https://doi.org/10.29312/remexca.v3i8.1328>

McKendrick, S. (2000). *Manual para la germinación in vitro de orquídeas*. Ceiba Foundation for Tropical Conservation. Ecuador.

Menchaca-García, R. A., Lozano Rodríguez, M. A., & Sánchez Morales, L. (2012). Estrategias para el aprovechamiento sustentable de las Orquídeas de México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 3(13), 9-16. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v3i13.485>

Menchaca-García, R. A., Martínez, D. M., Quelites, R., Red Quelites, & Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (Mexico). (2011). *Conservación de orquídeas, una tarea de todos*. Universidad Autónoma Chapingo.

- Metraux, J. P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W., & Inverardi, B. (1990). Increase in Salicylic Acid at the Onset of Systemic Acquired Resistance in Cucumber. *Science*, 250 (4983), 1004-1006. <https://doi.org/10.1126/science.250.4983.1004>
- Mika, A., Boenisch, M. J., Hopff, D., & Lühje, S. (2009). Membrane-bound guaiacol peroxidases from maize (*Zea mays* L.) roots are regulated by methyl jasmonate, salicylic acid, and pathogen elicitors. *Journal of Experimental Botany*, 61(3), 831-841. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp353>
- Minibayeva, F., Mika, A., & Lühje, S. (2003). Salicylic acid changes the properties of extracellular peroxidase activity secreted from wounded wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Protoplasma*, 221(1-2), 67-72. <https://doi.org/10.1007/s00709-002-0071-2>
- Molvray, M., & Kores, P. J. (1995). Character analysis of the seed coat in Spiranthoideae and Orchidoideae, with special reference to the diurideae (ORCHIDACEAE). *American Journal of Botany*, 82(11), 1443-1454. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1995.tb12682.x>
- Mora-Herrera M.E y López Delgado, H. (2006). Tolerancia a baja temperatura inducida por ácido salicílico y peróxido de hidrógeno en microplantas de papa. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29(2),81-85.
- Morais da Silva, J., Lacerda Medeiros, M. B. C., Correia Oliveira, J. T., Valente de Medeiros, E. K., de Souza-Motta, C. M., & Aparecida Moreira, K. (2018). Resistance inducers and biochemical mechanisms in the control of anthracnose in cowpea. *Ciencia e investigación agraria*, 45(3), 290-300. <https://doi.org/10.7764/rcia.v45i3.1962>

- Navarro-López, E. R.; Gil-Vázquez, I; Cruz-San Pedro, E. V.; Bastida-Tapia, A. (2001). *Botánica e identificación de orquídeas*. Serie de publicaciones Agribot. Departamento de Preparatoria Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
- Neelam, M., Rahul, M., Ajiboye, M., Kafayat, Y., & Lateefat, Y. (2014). Salicylic Acid Alters Antioxidant and Phenolics Metabolism in *Catharanthus roseus* Grown Under Salinity Stress. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 11(5), 118. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v11i5.19>
- Ng, C. K. Y., & Hew, C. S. (2000). Orchid pseudobulbs – ‘false’ bulbs with a genuine importance in orchid growth and survival! *Scientia Horticulturae*, 83(3-4), 165-172. [https://doi.org/10.1016/s0304-4238\(99\)00084-9](https://doi.org/10.1016/s0304-4238(99)00084-9)
- Pedraza-Santos, M.E. (2017). La propagación masiva de orquídeas (Orchidaceae); una alternativa de conservación de especies silvestres. *Agro Productividad* 6(10)., 31-36
- Peña, M. 1990. Orchidaceae. In: Rzedowski, G. C. de, J. Rzedowski (Eds.). (2010). *Flora fanerogámica del Valle de México*. Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. [Consultado el 2020, Ago 20]. Disponible en: [https://www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/librosDig/pdf/Flora\\_del\\_Valle\\_de\\_Mx1.pdf](https://www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/librosDig/pdf/Flora_del_Valle_de_Mx1.pdf)
- Poot-Poot, W. A., Delgado-Martínez, R., Castro-Nava, S., Segura-Martínez, M. T., Carreón-Pérez, A., & Hernández-Martínez, J. G. (2018). Effect of salicylic acid on pre-transplant acclimatization of native tomato populations. *Horticultura Brasileira*, 36(4), 480-485. <https://doi.org/10.1590/s0102-053620180409>
- Pospišilová, J., Ticha, I., Kadlecěk, P., Haisel, D., & Plzakova, S. (1999). Acclimatization of Micropropagated Plants to Ex Vitro Conditions. *Biologia plantarum*, 42(4), 481-497. <https://doi.org/10.1023/a:1002688208758>

- Raskin, I. (1992). Role of Salicylic Acid in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43(1), 439-463. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.43.060192.002255>
- Reid, W. V., Miller, K., World Resources Inst., W., & World Resources Institute. (1989). *Keeping Options Alive: The Scientific basis for conserving Biodiversity*. World Resources Institute.
- Reyna, Q. J y DEMOS, Desarrollo de Medios, S.A. de C.V. (2019, 16 junio). La Jornada: México, segundo mayor productor de orquídeas en AL. *La Jornada*. <https://www.jornada.com.mx/2019/06/16/economia/019n2eco>
- Rittershausen, B. y Rittershausen, W. (2006). *Orquídeas, Enciclopedia práctica*. Editorial Libsa.
- Rivas-San Vicente, M., & Plasencia, J. (2011). Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 62(10), 3321-3338. <https://doi.org/10.1093/jxb/err031>
- Rodríguez-Farfán, A.B. 2013. *Inducción de la germinación in vitro de Epidendrum radicans Pav. ex Lindl.* Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
- Rzedowski, J. (1991). Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Botanica Mexicana*, 14, 3. <https://doi.org/10.21829/abm14.1991.611>
- Salazar-Rojas, V., Herrera-Cabrera, E., Flores-Palacios, A., & Ocampo-Fletes, I. (2007). Traditional use and conservation of the “calaverita” *Laelia anceps* subsp. *dawsonii* f. *chilapensis* Soto-Arenas at Chilapa, Guerrero, México. *Lankesteriana*, 7(1-2), 368-370. <https://doi.org/10.15517/lank.v7i1-2.19566>

- Salazar Mercado, S. A., Amaya Nieto, A. Z., & Barrientos Rey, F. (2013). Evaluación de diferentes medios de cultivo in vitro en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 97. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v15n2.41268>
- Sahoo, L., Dadlani, M., Singh D.P. y Sharma S.P. 2000. Characterization of sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes using laboratory techniques. *Plant Varieties and Seeds* (13), 31-43.
- Sarmiento, F.M y Romero G., C. (2000). *Orquídeas mexicanas*. Banobras-Porrúa. México, D.F.
- Sarrou, E., Chatzopoulou, P., Dimassi-Theriou, K., Therios, I., & Koularmani, A. (2015). Effect of melatonin, salicylic acid and gibberellic acid on leaf essential oil and other secondary metabolites of bitter orange young seedlings. *Journal of Essential Oil Research*, 27(6), 487-496. <https://doi.org/10.1080/10412905.2015.1064485>
- SEMARNAT. 2009. *Manejo de vida silvestre, manual técnico para beneficiarios. Consejo Nacional Forestal. Documento en línea.* [conafor.gob.mx/biblioteca/manejo-de-vida-silvestre.pdf](http://conafor.gob.mx/biblioteca/manejo-de-vida-silvestre.pdf) [Consultado el 2020, Sep 17].
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana. NOM-059-SEMARNAT-2001. Protección Ambiental- Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestres- Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio Lista de especies en riesgo. México.
- Shakirova, F. M., Sakhabutdinova, A. R., Bezrukova, M. V., Fatkhutdinova, R. A., & Fatkhutdinova, D. R. (2003). Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Science*, 164(3), 317-322. [https://doi.org/10.1016/s0168-9452\(02\)00415-6](https://doi.org/10.1016/s0168-9452(02)00415-6)

- Soto-Arenas, M. A. (1993). Population studies in Mexican Orchids. In: Pridgeon A.M. (ed.). (1994). *Proceeding of 14th World Orchid Conference, Glasgow*. Stationery Office Books. P. 153-160
- Squire, D. (2004). *Las orquídeas del especialista*. Editorial Omega. Barcelona, España.
- Stevens, J., Senaratna, T. & Sivasithamparam, K. (2006). Salicylic Acid Induces Salinity Tolerance in Tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Roma): Associated Changes in Gas Exchange, Water Relations and Membrane Stabilisation. *Plant Growth Regul* 49, 77–83. <https://doi.org/10.1007/s10725-006-0019-1>
- Szeszko-Fabila., D. R. (2010). *La Orquideoflora Mexiquense*. México. Biblioteca Mexiquense del Bicentenario. Gobierno del Estado de México.
- Szalai, G., & Janda, T. (2009). Effect of Salt Stress on the Salicylic Acid Synthesis in Young Maize (*Zea mays*L.) Plants. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 195(3), 165-171. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037x.2008.00352.x>
- Tejeda-Sartorius, O., Téllez-Velasco, M.A.A. y Trejo-Téllez, L.I. (2017a). Características ornamentales de orquídeas silvestres y su propagación con fines comerciales. alternativa de aprovechamiento sustentable ex situ. *Agro Productividad* 6(10), 37-45
- Tejeda-Sartorius, O., Téllez-Velasco, M.A.A. y Escobar-Aguayo, J.J. (2017b). Estado de conservación de orquídeas silvestres (Orchidaceae). *Agro Productividad* 6(10), 3-12
- Téllez-Velasco, M.A.A., Flores-Villanueva, L. (2007) *Orquídeas terrestres del pedregal de San Ángel*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Téllez Velasco, M. A. A., Menchaca-García, R. A., Martínez, D. M., Santos, M. E. P. y Gil, M. S. Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (Mexico) y Universidad Autónoma Chapingo. (2011a).

*Diagnóstico de la familia Orchidaceae en México.* SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SNICS, SINAREFI, Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura.

Téllez Velasco, M.A.A; Menchaca-García, R. A., Martínez, D. M., Santos, M. E. P. y Laguna-Cerda. A. Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (Mexico) y Universidad Autónoma Chapingo. (2011b). *Análisis del diagnóstico de la familia Orchidaceae en México.* SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SNICS, SINAREFI, Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura.

Torres, J., Laskowski, L. y Sanabria, M. (2006). Efecto del ambiente de desarrollo sobre la anatomía de la epidermis foliar de *Cattleya jenmanii* Rolfe. *Bioagro* 18 (2), 93-99.

Tucuch Haas, Cesar J., & Alcántar González, Gabriel, & Larqué Saavedra, Alfonso (2015). Efecto del ácido salicílico en el crecimiento de la raíz y biomasa total de plántulas de trigo. *Terra Latinoamericana*, 33(1),63-68. [Consultado el 25 de Octubre de 2020]. ISSN: 2395-8030. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=573/57335800005>

Tucuch-Haas, C., Alcántar-González, G., Salinas-Moreno, Y., Trejo-Téllez, L. I., Volke-Haller, V. ´ ´. H., & Larqué-Saavedra, A. (2017). Aspersión foliar de ácido salicílico incrementa la concentración de fenoles en el grano de maíz. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(2), 235-238. <https://doi.org/10.35196/rfm.2017.2.235-238>

Venturieri, G. A., & Arbieto, E. A. M. (2011). Ex-vitro establishment of *Phalaenopsis amabilis* seedlings in different substrates. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 33(3), 495-501. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v33i3.3950>



- Venturieri, G. A., & Seidel Júnior, D. (2011). Ex vitro acclimatization of *Cattleya forbesii* and *Laelia purpurata* seedlings in a selection of substrates. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 33(1), 97-103. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v33i1.3939>
- Vidoz, M. L., Flachslan, E. A., Rey, H. Y., & Mroginski, L. A. (2008). Comportamiento ex vitro de Plantas de *Brassavola perrinii* (Orchidaceae) y de tres Híbridos Intergenéricos. *Ciencia y Técnica*, 1, 12-15.
- Villanueva R., E., & Sanchez G., P., & Rodríguez M., N., & Villanueva N., E., & Ortiz M., E., & Gutiérrez E., J. A. (1998). Efecto de reguladores del crecimiento y tipo de sustrato en el enraizamiento de *Kalanchoe*. *Terra Latinoamericana*, 16(1),33-41. [fecha de Consulta 25 de Octubre de 2020]. ISSN: 2395-8030. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=573/57316104>
- Waterman P.G., Mole, S. (1994). Analysis of Phenolic Plant Metabolites. *Blackwell Scientific Publication*, Oxford, 1-238.
- Yang, W., Zhu, C., Ma, X., Li, G., Gan, L., Ng, D., & Xia, K. (2013). Hydrogen Peroxide Is a Second Messenger in the Salicylic Acid-Triggered Adventitious Rooting Process in Mung Bean Seedlings. *PLoS ONE*, 8(12), e84580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084580>
- Zhou, B., Tang, X., & Wang, Y. (2010). Salicylic acid and heat acclimation pretreatment protects *Laminaria japonica* sporophyte (Phaeophyceae) from heat stress. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 28(4), 924-932. <https://doi.org/10.1007/s00343-010-9049-7>

## IXI. ANEXOS

Anexo 1. Carta de aceptación y constancia de participación en el Primer Congreso Mexicano de Fisiología Vegetal.



# 1<sup>er</sup> Congreso Mexicano de Fisiología Vegetal



Colegio de Postgraduados | Octubre 24-26

**ASUNTO:** CARTA DE ACEPTACIÓN  
021-N21  
08 de octubre de 2018

**Juan Manuel Olivares Aguilar**

PRESENTE

Por medio de la presente el comité organizador del congreso le informa que el título:

**Efecto del ácido salicílico en el desarrollo de *Epidendrum* sp. en condiciones *in vitro***

Someído para participar en la sesión de carteles del "1<sup>er</sup> Congreso Mexicano de Fisiología vegetal", que se llevará a cabo en el Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo del 24 al 26 de octubre del 2018, bajo la temática **fisiología vegetal- respuestas a estrés** ha sido **ACEPTADO**.

Agradecemos su participación y aprovechamos para enviar saludos cordiales.

ATENTAMENTE

Comité organizador del 1<sup>er</sup> Congreso Mexicano de Fisiología Vegetal

 Dr. F. Alfonso Larqué Saavedra	 Dr. Oscar J. Ayala Garay
Dr. Serafin Cruz Izquierdo Dr. Marcos Soto Hernández Dr. Carlos Trejo Lopez Dra. Mariana Palma Tenango Dr. Humberto Lopez Delgado Dr. Rene Garuña Hernandez	Dr. Eduardo Villanueva Couch Dra. Mirna Valdéz Hernández Dra. Claudia González Salvatierra Dra. Casandra Reyes Garcia Dr. Jorge Santamaría Fernández Dr. José Luis Andrade Torres

Km. 36.5 Carretera México-Texcoco, CP. 56230, Montecillo, Texcoco Edo. de México.  
<http://www.congreso.redfisiologovegetales.com.mx/>

Derechos reservados: <http://www.redfisiologovegetales.com.mx/>



# 1<sup>er</sup> Congreso Mexicano de Fisiología Vegetal

Se otorga la presente **CONSTANCIA** a

Juan Manuel Olivares Aguilar, Martha Elena Mora Herrera

Por su participación como **PONENTE** en la sesión de carteles del Primer Congreso Mexicano de Fisiología Vegetal con el tema:

**Efecto del ácido salicílico en el desarrollo de *Epidendrum* sp. en condiciones *in vitro***

24, 25 y 26 de octubre de 2018  
Texcoco, Estado de México, México

ATENTAMENTE

Comité organizador del 1<sup>er</sup> Congreso Mexicano de Fisiología Vegetal

Dr. F. Alfonso Larqué Saavedra

Dr. Oscar J. Ayala Garay

Dra. Mariana Palma Tenango  
Dr. Humberto López Delgado  
Dr. Rene Garruña Hernandez

Dr. Marcos Soto Hernández  
Dr. Carlos Trejo Lopez  
Dr. Serafin Cruz Izquierdo

Dr. Eduardo Villanueva Couch  
Dra. Mirna Valdéz Hernández  
Dra. Claudia González Salvatierra

Dra. Casandra Reyes García  
Dr. Jorge Santamaria Fernández  
Dr. José Luis Andrade Torres



Anexo 2. Carta de aceptación y constancia de participación en el Segundo Congreso Mexicano de Fisiología Vegetal.



**2<sup>do</sup> Congreso Mexicano  
de  
Fisiología Vegetal**  
6 al 8 de Noviembre de 2019  
Centro de Investigación Científica de Yucatán



**ASUNTO:** CARTA DE ACEPTACIÓN  
059-054  
22 de Octubre del 2019

**Martha Elena Mora Herrera**

PRESENTE

Por medio de la presente el comité organizador del congreso le informa que el título:

**Efecto del ácido salicílico en la actividad peroxidasa de *Laelia autumnalis* en condiciones *in vitro***

Sometido para participar en la sesión de carteles del "2<sup>o</sup> Congreso Mexicano de Fisiología vegetal", que se llevará a cabo en el Centro de Investigación Científica de Yucatán del 6 al 8 de noviembre del 2019, bajo la temática **estrés biótico-abiótico**, ha sido **ACEPTADO**.

Agradecemos su participación y aprovechamos para enviar saludos cordiales.

ATENTAMENTE

Comité organizador del 2<sup>o</sup> Congreso Mexicano de Fisiología Vegetal

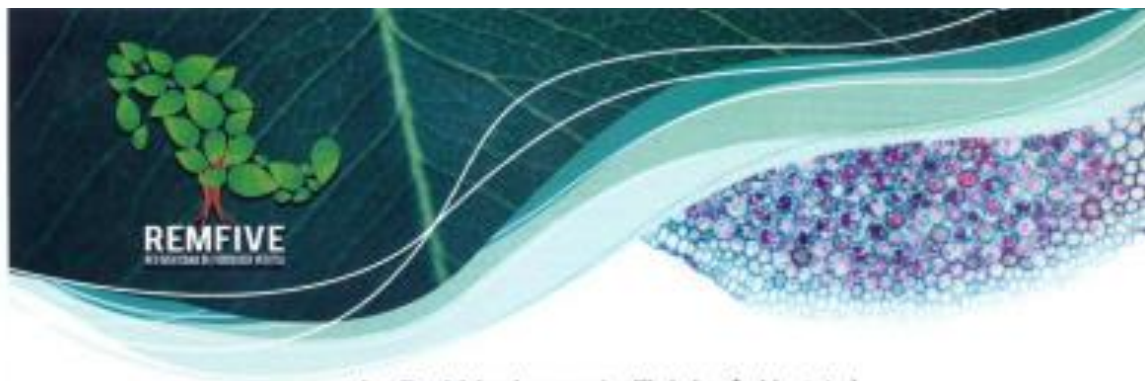


Dr. F. Alfonso Larqué Saavedra  
Director de la Red Mexicana de Fisiología Vegetal

Dra. Mariana Palma Tenango	Dr. Eduardo Villanueva Couch
Dr. Oscar J. Ayala Garay	Dra. Mirna Valdéz Hernández
Dr. Serafin Cruz Izquierdo	Dra. Claudia González Salvatierra
Dr. Marcos Soto Hernández	Dra. Casandra Reyes García
Dr. Carlos Trejo Lopez	Dr. Jorge Santamaria Fernández
Dr. Humberto Lopez Delgado	Dr. José Luis Andrade Torres
Dr. Rene Garuña Hernandez	

Calle 23 No. 122 por 24, Fracc. Loma Bonita C.P. 97205, Mérida, Yucatán, México.  
<http://www.congreso.redfisiologovegetales.com.mx/>

Derechos reservados: <http://www.redfisiologovegetales.com.mx/>



La Red Mexicana de Fisiología Vegetal  
otorga la presente

# CONSTANCIA

8:

**Juan Manuel Olivares Aguilar;  
Martha Elena Mora Herrera**

por su participación con el cartel  
"Efecto del ácido salicílico en la actividad peroxidasa  
de *Laela autumnalis* en condiciones *in vitro*"  
en el Segundo Congreso Mexicano de Fisiología Vegetal,  
realizado del 6 al 8 de noviembre  
en el Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Dr. Francisco Alfonso  
Larqué Saavedra

Dra. Casandra  
Reyes Garcia

Dr. Jorge Santamaría  
Fernández


Dr. José Luis  
Andrade Torres

Miembros del Comité Organizador


Mérida, Yucatán. Noviembre de 2019.



Anexo 3. Constancia de participación en el Seminario de Agronomía en Floricultura 2020ª en el Centro Universitario UAEM Tenancingo.



CUT



Universidad Autónoma del Estado de México



**El Centro Universitario UAEM Tenancingo**  
Otorga la presente

**A: P. ING. AGR. EN FLORIC. JUAN MANUEL OLIVARES AGUILAR**

*Por su participación con la ponencia "Evaluación de ácido salicílico en la supervivencia ex vitro de Laelia autumnalis, Epidendrum sp. Y Encyclia sp." en la modalidad de avances de investigación, presentada en el marco del Quinto Ciclo de Conferencias Sobre la Sustentabilidad en la Floricultura*

22 de febrero de 2019

*Patria, Ciencia y Trabajo*  
"2019, Año del 75 aniversario de la Autonomía (CLA-UAEM)"



Dr. en C. Sotero Aguilar Medel  
Director

Centro Universitario  
UAEM Tenancingo

**CONSTANCIA**