



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

**EFFECTO DEL AGUAMIEL–PULQUE Y AUXINAS-
CITOCININAS EN LA INDUCCIÓN *in vitro* DE PLBs EN
Phalaenopsis sp.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO EN FLORICULTURA

PRESENTA:

RODRIGO ROSAS CHÁVEZ

NUMERO DE CUENTA 1022009

GENERACIÓN 39^a

MODALIDAD: TESIS INDIVIDUAL

ASESOR DE TESIS:

DR. AMAURY MARTÍN ARZATE FERNÁNDEZ

FEBRERO, 2018.



CAMPUS UNIVERSITARIO “EL CERRILLO”, EL CERRILLO
PIEDRAS BLANCAS, MUNICIPIO DE TOLUCA, MÉXICO

ÍNDICE

| | Página |
|--|--------|
| DEDICATORIAS..... | iii |
| AGRADECIMIENTOS..... | iv |
| LISTA DE CUADROS..... | vii |
| LISTA DE FIGURAS..... | viii |
| RESUMEN..... | ix |
| ABSTRACT..... | x |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 Objetivo general..... | 2 |
| 1.2 Objetivos específicos..... | 2 |
| 1.3 Hipótesis..... | 3 |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA..... | 4 |
| 2.1 Generalidades de <i>Phalaenopsis</i> | 4 |
| 2.2 Importancia económica de <i>Phalaenopsis</i> | 5 |
| 2.3 Multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Phalaenopsis</i> | 6 |
| 2.4 Embriogénesis somática (ES)..... | 7 |
| 2.5 Factores que influyen en el proceso de embriogénesis somática..... | 8 |
| 2.5.1 Reguladores de crecimiento vegetal (RCV)..... | 9 |
| 2.5.1.1 Auxinas..... | 9 |
| 2.5.1.2 Citocininas..... | 10 |
| 2.5.2 Complejos Orgánicos (CO)..... | 10 |
| 2.6 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Phalaenopsis</i> | 13 |
| 2.6.1 PLBs..... | 14 |
| 2.6.2 Hoja..... | 15 |
| 2.6.3 Raíz..... | 16 |

| | |
|--|----|
| III. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 18 |
| 3.1 Ubicación del experimento..... | 18 |
| 3.2 Material vegetal..... | 18 |
| 3.3 Inducción de protocormos (PLBs)..... | 18 |
| 3.4 Condiciones de cultivo <i>in vitro</i> | 19 |
| 3.5 Evaluación de Complejos Orgánicos (CO) y Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV) | 20 |
| 3.6 Regeneración de plántulas <i>in vitro</i> | 21 |
| 3.7 Variables evaluadas..... | 21 |
| 3.8 Análisis estadístico..... | 22 |
| 3.9 Aclimatación de plantas a condiciones <i>ex vitro</i> | 22 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 23 |
| 4.1 Inducción de protocormos (PLBs)..... | 23 |
| 4.2 Efecto de los complejos orgánicos sobre la inducción de PLBs a partir de PLBs | 24 |
| 4.3 Efecto de los reguladores de crecimiento (RCV) sobre la inducción de PLBs a partir de secciones de hoja..... | 27 |
| 4.4 Aclimatación de plantas a condiciones <i>ex vitro</i> | 30 |
| V. CONCLUSIONES..... | 31 |
| VI. GLOSARIO..... | 32 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA..... | 35 |

LISTA DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Características fisicoquímicas del Aguamiel..... | 11 |
| Cuadro 2. Propiedades químicas del Pulque..... | 12 |
| Cuadro 3. Características fisicoquímicas del Pulque..... | 13 |
| Cuadro 4. Análisis de varianza para evaluar el efecto de los complejos orgánicos y sus concentraciones en la inducción de PLBs en <i>Phalaenopsis</i> sp. var. Dudu a las 8 SDE..... | 25 |
| Cuadro 5. Prueba de comparación de medias, para evaluar el efecto del Aguamiel, Pulque y sus concentraciones en la inducción de PLBs a partir de explantes de PLBs en <i>Phalaenopsis</i> sp. var. Dudu a las 8 SDE..... | 26 |
| Cuadro 6. Análisis de varianza para evaluar el efecto de 9 tratamientos y 3 periodos de oscuridad en la inducción de PLBs a partir de explantes de hoja en <i>Phalaenopsis</i> sp. var. Dudu a las 6 semanas bajo luz..... | 28 |
| Cuadro 7. Prueba de comparación de medias, para evaluar el efecto de la concentración de citocinina (2,4-D) y auxina (BA) en la inducción de PLBs a partir de explantes de hoja en <i>Phalaenopsis</i> sp. var. Dudu a las 6 semanas bajo luz..... | 30 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Inducción <i>in vitro</i> de PLBs de <i>Phalaenopsis</i> sp. a partir de secciones de hoja en el tratamiento con 5 mg L ⁻¹ de 2,4-D y 2 mg L ⁻¹ de BA a la cuarta semana expuestos a la luz..... | 23 |
| Figura 2. Inducción <i>in vitro</i> de PLBs de <i>Phalaenopsis</i> sp. a partir de explantes de PLBs con una concentración de 10 ml L ⁻¹ Pulque..... | 24 |
| Figura 3. Adaptación de plántulas a condiciones <i>ex vitro</i> | 30 |

RESUMEN

EFFECTO DEL AGUAMIEL–PULQUE Y AUXINAS-CITOCININAS EN LA INDUCCIÓN *in vitro* DE PLBs EN *Phalaenopsis* sp.

Rodrigo Rosas Chávez *. Ingeniero Agrónomo en Floricultura. Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas. Director de Tesis: **Amaury Martín Arzate-Fernández¹**.

*Autor para correspondencia: rrodrigo1992@gmail.com

¹Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado México. Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km. 11.5. Campus Universitario “El Cerrillo”, C.P. 50200, Toluca, Estado de México, México. Correspondencia: ¹amaury1963@yahoo.com.mx

Phalaenopsis es una orquídea apreciada a nivel mundial tanto en maceta como flor de corte. Sin embargo su reproducción natural es difícil debido a su lento crecimiento monopodial. Por ello, es necesario establecer nuevos protocolos de propagación *in vitro* para eficientar su multiplicación. El objetivo del presente trabajo fue inducir la formación de PLBs en *Phalaenopsis* sp. var. Dudu a partir de dos tipos de explantes: PLBs y secciones de hoja. Para los explantes de PLBs se evaluaron dos complejos orgánicos (CO): Aguamiel y Pulque en cuatro concentraciones (0, 10, 50 y 100 ml L⁻¹), mientras que para las secciones de hoja se evaluó la combinación de dos Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV) en tres concentraciones (3, 4 y 5 mg L⁻¹ de 2,4-D y 1, 2 y 3 mg L⁻¹ de BA) y tres periodos de oscuridad (14, 21 y 28 días). Los resultados obtenidos de la inducción a partir de PLBs revelaron que el tratamiento con 10 ml L⁻¹ del CO Pulque fue el mejor tratamiento con una media de 41.4 ± 5.7 PLBs por explante. Para el caso de los explantes de hoja, el tratamiento con 5 mg L⁻¹ de 2,4-D y 2 mg L⁻¹ de BA indujo la mayor media con 8.83 ± 1.29 PLBs por explante, mientras que los periodos de oscuridad no tuvieron un efecto estadísticamente significativo en la inducción de PLBs.

Palabras clave: *Phalaenopsis*, PLBs (protocorm-like-bodies), Aguamiel, Pulque, 6-Bencil adenina (BA), ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D).

ABSTRACT

EFFECT OF AGUAMIEL-PULQUE AND AUXINS-CYTOKININS IN THE *In vitro* INDUCTION OF PLBs IN *Phalaenopsis* sp.

Rodrigo Rosas Chávez *. Ingeniero Agrónomo en Floricultura. Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas. Director de Tesis: **Amaury Martín Arzate-Fernandez¹**.

*Autor para correspondencia: rrodrigo1992@gmail.com

¹Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado México. Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km. 11.5. Campus Universitario "El Cerrillo", C.P. 50200, Toluca, Estado de México, México. Correspondencia: ¹amaury1963@yahoo.com.mx

Phalaenopsis is an orchid appreciated worldwide in both pot and flower cut. However its natural reproduction is difficult due to its slow monopodial growth. Thus new *in vitro* propagation protocols are necessary to efficient multiplication. The objective of the present work was to induce the formation of PLBs in *Phalaenopsis* sp. var. Dudu from two types of explants: PLBs and leaf sections. For PLBs explants two organic complexes (CO) were evaluated: Aguamiel and Pulque in four concentrations (0, 10, 50 and 100 ml L⁻¹), while for leaf sections the combination of two Growth Regulators (3, 4 and 5 mg L⁻¹ of 2,4-D and 1, 2 and 3 mg L⁻¹ of BA) and three periods of darkness (14, 21 and 28 days) were evaluated. The results obtained from induction from PLBs revealed that treatment with 10 ml L⁻¹ of Pulque was the best treatment with an average of 41.4 ± 5.7 PLBs per explant. For the leaf explants, treatment with 5 mg L⁻¹ of 2,4-D and 2 mg L⁻¹ of BA induced the highest mean with 8.83 ± 1.29 PLBs per explant, whereas the dark periods had not a statistically significant effect on the PLBs induction.

Keywords: *Phalaenopsis*, PLBs (protocorm-like-bodies), Aguamiel, Pulque, 6-Benzyladenine (BA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4- D).

I. INTRODUCCIÓN

La familia de las orquídeas está representada por aproximadamente 35 000 especies y numerosos híbridos, es considerada la más evolucionada y la más grande en el reino vegetal (Rodrigues *et al.*, 2009).

Phalaenopsis es una orquídea epífita, originaria del sureste de Asia, India, Indonesia y parte de Australia (Feria *et al.*, 2007), se cultiva principalmente como flor de corte y como planta ornamental para decoración de interiores.

En los Estados Unidos, Japón y muchos países europeos, no sólo la producción nacional, sino también su importación se incrementó rápidamente (Su y Hsu, 2003). En 2004 se estimó que en laboratorios de Alemania se produjeron de manera *in vitro* más de 31 millones de plantas (Sinha *et al.*, 2010).

Sin embargo, su crecimiento monopodial, es decir, a partir de una yema apical hace que se dificulte su propagación vegetativa, al tiempo que su reproducción sexual es afectada por la esterilidad en algunos de sus híbridos (Feria *et al.*, 2007).

La mayoría de las *Phalaenopsis* spp. cultivadas comercialmente son reproducidas por semillas, en consecuencia se expresa un amplio espectro de variabilidad fenotípica, con diferencias en la forma de crecimiento, tiempo de floración y hasta en las características florales. Se han desarrollado protocolos para la propagación *in vitro* tanto por embriogénesis somática como por organogénesis a partir de diferentes tejidos de la planta como hojas, ápices radiculares, ápices caulinares y secciones del escapo floral (Feria *et al.*, 2007).

Muchos de estos protocolos se realizaron con el objetivo de obtener la formación de cuerpos protocórmicos a partir de los cuales se logra la regeneración de plantas, y con ello se pueden minimizar las dificultades que se presentan al emplear semillas. Los protocormos son cuerpos que se encuentran en un estado intermedio entre un embrión cigótico y un vástago, cuando estos cuerpos se forman sobre tejido reciben el nombre de cuerpos protocórmicos o Protocorm-like Bodies (PLBs por sus siglas en inglés) (Feria *et al.*, 2007).

Se sabe que el tipo de medio de cultivo, complejos orgánicos (CO) por ejemplo agua de coco, concentración y combinación de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) y el tipo de tejido vegetal afectan de manera diferente a cada especie o híbrido de *Phalaenopsis* por lo cual es necesario realizar mayores ensayos para consolidar un protocolo eficiente en la clonación *in vitro* de esta especie.

En función a lo anterior el presente trabajo planteo los siguientes objetivos:

1.1 Objetivo general

- Inducir la formación de PLBs (protocormos) en *Phalaenopsis* sp. var. Dudu.

1.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de los complejos orgánicos (Aguamiel y Pulque) en la inducción de PLBs a partir de explantes de PLBs en *Phalaenopsis* sp. var. Dudu.

- Evaluar el efecto de la combinación de los reguladores de crecimiento vegetal: ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y 6-Bencil adenina (BA) así como el periodo en oscuridad en la inducción de PLBs a partir de explantes de hoja en *Phalaenopsis* sp. var. Dudu.
- Inducir la regeneración de plantas de *Phalaenopsis* sp. var. Dudu a partir de explantes de PLBs y hoja.
- Adaptar a condiciones *ex vitro* las plantas de *Phalaenopsis* sp. var. Dudu regeneradas.

1.3 Hipótesis

- Es posible inducir un mayor número de protocormos (PLBs) a partir de explantes de PLBs en *Phalaenopsis* sp. var. Dudu en al menos una concentración de Aguamiel o Pulque.
- Es posible inducir un mayor número de protocormos (PLBs) a partir de explantes de hoja en *Phalaenopsis* sp., var. Dudu en al menos una combinación de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y de 6-Bencil adenina (BA).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades de *Phalaenopsis*

Phalaenopsis procede del griego *phalaina*, “mariposa” y *opsis*, “parecido”, debido a las inflorescencias de algunas especies, que recuerdan a mariposas en vuelo. Por ello, a las especies se les llama “orquídeas mariposa”.

Phalaenopsis es un género de la familia Orquidaceae, conformado por aproximadamente 66 especies (Salazar *et al.*, 2013).

Phalaenopsis sp. es una orquídea epífita, originaria del sureste de Asia, India, Indonesia y parte de Australia (Feria *et al.*, 2007). Son orquídeas sin pseudobulbos, los brotes emergen del rizoma central monopodial por lo tanto el tallo es corto, robusto, completamente cubierto por la imbricación de la base de las hojas, las cuales son oblongas gruesas con nervadura central hundida, a veces coriáceas, de un verde claro tanto en el haz como el envés, aunque más brillantes en el haz, pudiendo alcanzar más de 50 cm de longitud, amplias de hasta 10 cm con la capacidad de retener agua; sus raíces son largas y carnosas a menudo ramificadas, glabras, flexuosas, con extremidades verdes (Ajú, 2009).

Las flores son de diferentes tamaños y colores, que le confieren un aspecto atractivo como planta ornamental (Salazar y Orlando, 2012). Como resultado de extensivos trabajos de hibridación, este género representa uno de los grupos de orquídeas más apreciados por el colorido, forma y duración de sus flores como planta en maceta o flor cortada a nivel mundial (Salazar *et al.*, 2013).

2.2 Importancia económica de *Phalaenopsis*

Algunos géneros de orquídeas, tales como *Phalaenopsis*, *Dendrobium*, *Oncidium*, *Paphiopedilum* y *Cymbidium*, se han convertido económicamente importantes como plantas en maceta y flores cortadas. De acuerdo con el Informe del Departamento de Agricultura de Estados Unidos, el valor total anual de orquídeas en maceta en el año 2007 fue de 126 millones de dólares (Lee, 2011).

Phalaenopsis sp. ha ganado popularidad en todo el mundo en los últimos años; debido principalmente a sus hermosas flores, facilidad de cultivo en condiciones artificiales y a su larga vida en florero (Jia-Hua y Jen-Tsung, 2014).

En el año 2000 el 75 % de las ventas de orquídeas en el mercado consistieron en *Phalaenopsis* sp. en maceta, lo que representó un valor de 75 millones de dólares (Suriyan *et al.*, 2009)., 5 años después alcanzó un valor de 144 millones de dólares (Runkle *et al.*, 2007).

Debido a su alto valor económico, Países Bajos, Alemania, China, Taiwán, Estados Unidos y Japón muestran una producción a gran escala de *Phalaenopsis* sp. en maceta (Griesbach, 2002). Taiwán es actualmente el mayor exportador de *Phalaenopsis* sp. en el mundo. Las estadísticas en 2012 del Consejo para la Agricultura (COA, siglas en inglés) reportan un valor de exportación en Taiwán de *Phalaenopsis* sp. de 114 millones de dólares o el 69 % del valor total de sus exportaciones de flores. (<http://www.taiwanembassy.org/ES/ct.asp?xItem=549302&ctNode=12419&mp=1>).

Durante los últimos años las ventas de *Phalaenopsis* sp. han ido en aumento. Por lo tanto es necesario el mejoramiento de protocolos de multiplicación, así como la creación de nuevos híbridos de esta especie para lograr satisfacer este mercado (Griesbach, 2002).

Para satisfacer la demanda futura, se ha recurrido a la utilización de herramientas biotecnológicas de micropropagación masiva como la embriogénesis somática, debido a que con esta técnica se han obtenido un mayor número de plantas, en espacios reducidos, a bajos costos y en un periodo de tiempo relativamente corto (Musharof *et al.*, 2013).

2.3 Multiplicación *in vitro* de *Phalaenopsis*

El crecimiento de *Phalaenopsis* en condiciones naturales es lento, debido a la dependencia de una relación simbiótica con un hongo formador de micorriza, lo que ha dificultado la multiplicación vegetativa (Murdad *et al.*, 2010). En cuanto a la reproducción sexual, *Phalaenopsis* se ha visto perjudicada por la esterilidad de algunos de sus híbridos (Mercado *et al.*, 2013).

La propagación natural de *Phalaenopsis* es difícil y demanda mucho tiempo, las técnicas de cultivo *in vitro* han permitido obtener grandes volúmenes de *Phalaenopsis* con el fin de producir plantas a gran escala para el comercio. Sin embargo, es indispensable la utilización de medios de cultivos simples, que permitan disminuir los costos de producción en *Phalaenopsis*. No obstante el éxito depende del tipo de explante a utilizar, como consecuencia de lo anterior, se han desarrollado varias formas de propagación clonal *in vitro* de *Phalaenopsis*, entre ellas la formación de embriones somáticos a partir de callos y la formación de cuerpos similares a protocormos (PLBs) a partir de varios tejidos como: PLBs, hojas, ápices radicales, ápices de vástagos, secciones de ejes florales, cuellos o coronas y callos, para su posterior regeneración en plántulas (Tirado *et al.*, 2005).

Varios medios de cultivos se han utilizado para la propagación *in vitro* de *Phalaenopsis*, el medio Vacin y Went (VW) (Vacin y Went, 1949), el medio Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962), el medio Knudson C (KC) (Knudson, 1946) y el medio Hyponex (Nishimura, 1982). Actualmente se ha mejorado la germinación de orquídeas, suplementando los medios de cultivos con componentes orgánicos (Salazar y Orlando, 2012).

El termino protocormo fue acuñado por Noe Bernard en 1909 para designar una etapa esférica que se presenta en el desarrollo de los embriones durante la germinación de las orquídeas. Estas estructuras poseen un alto grado de totipotencia, por lo que se puede inducir la brotación múltiple obteniendo varias plantas que se generan a partir de un explante con un alto grado de estabilidad genética, estos brotes esféricos nuevos son llamados PLBs (Real *et al.*, 2007).

2.4 Embriogénesis somática (ES)

Los embriones que no resultan de la fusión de gametos se definen como embriones somáticos, asexuales o adventicios. Son estructuras bipolares con un eje radical-apical, no poseen conexión vascular con el tejido materno y son capaces de crecer y formar plantas normales (SEDECI, 2017).

La ES es considerada una poderosa herramienta biotecnológica para la regeneración y mejoramiento de plantas, esta puede ser inducida de forma directa o indirecta (Nava, 2015).

La regeneración directa sin formar callo acorta el periodo de tiempo necesario para la propagación y reduce la posibilidad de que ocurra variación somaclonal (Košir *et al.*, 2004).

La inducción de embriones somáticos está condicionada por la presencia de reguladores del crecimiento vegetal en el medio de cultivo, fundamentalmente auxinas y citocininas (Celestino *et al.*, 2005). Y es el método más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro* (Freire, 2003).

Los PLBs son embriones somáticos en las orquídeas ya que en las primeras etapas de su formación muestran características citológicas similares al desarrollo de embriones cigóticos (Chien *et al.*, 2015).

2.5 Factores que influyen en el proceso de embriogénesis somática (ES)

La capacidad para producir embriones somáticos está genéticamente predeterminada (Arnold *et al.*, 2002), los aspectos que más influyen sobre la embriogénesis somática son: los reguladores de crecimiento vegetal, genotipo, tipo de explante, estado de desarrollo del explante, tamaño del explante y el medio de cultivo (Viñas y Jiménez, 2011).

La adición de complejos orgánicos al medio de cultivo facilita la inducción, multiplicación o proliferación de los explantes (Sánchez, 2015).

2.5.1 Reguladores de crecimiento vegetal (RCV)

El desarrollo de las plantas está influenciado por la interacción de factores externos e internos. Dentro de los factores internos se incluyen los RCV, las cuales se definen como señales químicas que facilitan la comunicación entre las células y coordinan sus actividades. El control hormonal lo realizan cinco grupos principales: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno y ácido abscísico (Pérez, 2005).

Dichos RCV son diferentes entre sí, tanto en sus características químicas como en la capacidad que poseen para inducir respuestas de crecimiento y diferenciación (Nava, 2015).

La proporción entre auxinas y citocininas permite regular la organogénesis o la desdiferenciación (SEDICI, 2017). Por lo tanto los RCV son utilizados en diversas técnicas de multiplicación masiva como la micropropagación (Nava, 2015); dicha técnica es empleada en especies de interés comercial como las orquídeas (Khosravi *et al.*, 2008).

2.5.1.1 Auxinas

El nombre auxina significa en griego 'crecer' y es dado a un grupo de sustancias que estimulan la elongación (Pérez, 2005). Las auxinas más utilizadas son: AIA (ácido 3 indol acético), ANA (ácido naftalenacético), 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético), AIB (ácido indolbutírico), pCPA (ácido clorofenoxiacético) y BTOA (ácido benzotiazol-2-oxiacético) (SEDICI, 2017).

Las auxinas participan en diferentes procesos del desarrollo vegetal: alargamiento o elongación celular, formación de raíces adventicias, partenocarpia, tropismos, promoción de biosíntesis del etileno, entre otros (Pérez, 2005).

2.5.1.2 Citocininas

Las citocininas son derivadas de la adenina entre ellas cabe mencionar las siguientes: BA (6-Bencil adenina), K (cinetina o 6-furfuril aminopurina), Zea (zeatina) y 2-iP (N-isopentenil adenina) (SEDICI, 2017). Las citocininas regulan varios procesos del desarrollo de las plantas, incluyendo división celular, proliferación de yemas axilares, senescencia foliar y floración, entre otros. Gran parte de estos procesos están afectados por otros estímulos, especialmente ambientales y hormonales. Como caso típico esta la interacción de las citocininas con las auxinas que se utiliza para regular la neoformación de órganos *in vitro* y controlar la dominancia apical fundamental en la industria de la micropropagación (Pérez, 2005).

2.5.2 Complejo orgánico (CO)

Un gran número de complejos orgánicos y/o aditivos orgánicos, como el agua de coco, pulpa de banana, jugo de tomate, jugo de piña, etc., se han empleado en el mejoramiento de los medios de cultivo para la germinación, proliferación, multiplicación y desarrollo de orquídeas (Pant, 2013).

El agua de coco es el más común debido a que contiene muchas sustancias nutritivas y hormonales, a saber: aminoácidos, ácidos orgánicos, iones inorgánicos, vitaminas, azúcares, lípidos, compuestos nitrogenados, auxinas, giberelinas, citocininas, etc. (Tan *et al.*, 2012).

El Aguamiel y el Pulque son sustancias que no se han evaluado como complejos orgánicos en la micropropagación *in vitro*.

El aguamiel es obtenido del agave (*Agave salmiana*), es un líquido dulce (7 a 14 °Baumé), éste puede ser ácido o ligeramente alcalino, incoloro y transparente. Posee un ligero olor herbáceo y contiene diversos minerales, además de ser rico en aminoácidos (aspártico, glutámico, lisina, metionina, cisteína, etc.), carbohidratos (inulina, sacarosa, fructosa, etc.) y proteínas (Flores *et al.*, 2006).

En el cuadro 1 se presentan las características fisicoquímicas del Aguamiel (Flores *et al.*, 2006).

Cuadro 1. Características fisicoquímicas del Aguamiel

| Características | Valor |
|--|--------------|
| Densidad (g L ⁻¹) | 1.29 |
| pH | 6.30 |
| Índice de refracción | 1.35 |
| Sólidos solubles (°Brix) | 11.44 |
| Acidez (%) | 1.65 |
| Humedad (%) | 87.00 |
| Proteínas (g L ⁻¹) | 3.41 |
| Cenizas (g L ⁻¹) | 0.53 |
| Azúcares reductores (g L ⁻¹) | 1.63 |
| Glucosa (mg L ⁻¹) | 2.31 |
| Fructuosa (mg L ⁻¹) | 4.70 |

De la fermentación del aguamiel, que tarda aproximadamente entre 24 y 48 horas, se obtiene la bebida alcohólica conocida como pulque.

El Pulque es una bebida con contenido alcohólico de 4 %, 9 % de azúcares (sacarosa), es de color blanco, olor fuerte y viscoso. En el cuadro 2 se presentan las propiedades químicas del pulque, en el cuadro 3 las características fisicoquímicas (Breña *et al.*, 2010).

Cuadro 2. Propiedades químicas del Pulque

| Propiedad | Valor |
|---------------------------------------|--------------|
| Humedad (%) | 79.00 |
| Calcio (mg L ⁻¹) | 10.00 |
| Fósforo (mg L ⁻¹) | 10.00 |
| Hierro (mg L ⁻¹) | 0.70 |
| Tiamina (B1) (mg L ⁻¹) | 0.02 |
| Riblovania (B2) (mg L ⁻¹) | 0.02 |
| Niacina (PP) (mg L ⁻¹) | 0.30 |
| Ácido ascórbico (mg L ⁻¹) | 6.20 |

Cuadro 3. Características fisicoquímicas del Pulque

| Características | Valor |
|---------------------------------|-------|
| pH | 5.30 |
| Densidad (g L ⁻¹) | 1.01 |
| Sólidos Totales | 4.63 |
| Cenizas (g L ⁻¹) | 0.275 |
| Proteínas (mg L ⁻¹) | 0.35 |
| Índice de Refracción | 1.33 |

2.6 Cultivo *in vitro* en *Phalaenopsis*

El cultivo de tejidos vegetales resulta de gran utilidad para la propagación de plantas a escalas mayores que las obtenidas por métodos tradicionales (Lee, 2007); la embriogénesis somática, actualmente permite la propagación masiva mediante el cultivo *in vitro*. Existen numerosos protocolos de embriogénesis somática en *Phalaenopsis* a partir de explantes como yemas axilares, ápices, secciones de hoja, PLBs, semillas fecundadas e inmaduras (Lee, 2007), aunque la utilización de diferentes medios de cultivos puede disminuir los costos de producción de *Phalaenopsis* el éxito depende del tipo de explante a utilizar (Mercado *et al.*, 2013).

Debido a esto, diversos autores han recurrido a la utilización de diferentes tipos de explantes para la obtención de un mayor número de plantas en un periodo de tiempo relativamente corto, siendo los explantes de hoja, PLBs y raíz los más conocidos (Sánchez, 2015).

2.6.1 PLBs

Los PLBs son considerados los mejores explantes para la micropropagación en orquídeas, debido a las altas tasas de multiplicación obtenidas en cortos periodos de tiempo y espacios reducidos, su facilidad de manipulación y transporte; ya que un gran número de PLBs se pueden colocar dentro de un recipiente en espacios limitados (Chien *et al.*, 2015).

Tirado *et al.* (2005), reportaron una media de 8.2 PLBs por explante en *Phalaenopsis* sp. con un medio MS al 50 % con 5 mg L⁻¹ de TDZ y 15 g L⁻¹ de sacarosa en un medio de inmersión temporal “RITA” mientras que Cheng y Chan (2006), obtuvieron una media de 13.8 PLBs por explante en *Phalaenopsis* en un medio MS al 50 % con 3 mg L⁻¹ de TDZ.

Real *et al.* (2007), indujeron una media de 4.6 PLBs en un medio MS con 0.5 mg L⁻¹ de BA en explantes de *Mormodes maculata*, así mismo David *et al.* (2008), indujeron un promedio de 9 ± 2 PLBs por explante en *Vanda helvola* en un medio basal Knudson C (KC) en combinación de 2 mg L⁻¹ de BAP y 0.5 mg L⁻¹ de ANA.

Peak *et al.* (2011), reportan un promedio de 10 a 20 PLBs en un medio VW con 3 mg L⁻¹ de BA, 1 mg L⁻¹ de TDZ y 10 % de agua de coco, mientras que Sinha y Jahan (2011), reportaron una media de inducción a las ocho semanas de cultivo de 44.5 ± 3.2 PLBs por explante en un medio de cultivo MS al 50 %, 10 % de agua de coco, 150 mg L⁻¹ L-glutamina, 2 % de sacarosa, 2 g L⁻¹ peptona y 1 g L⁻¹ de carbón activo. Asimismo, sin adicionar agua de coco obtuvieron una media de PLBs de 20.4 ± 1.3 por explante.

2.6.2 Hoja

Al utilizar secciones de hojas se puede disponer de material vegetal sin depender de la floración de la planta (Feria *et al.*, 2007).

Diferentes autores reportan resultados favorables con este explante entre ellos:

So-Young *et al.* (2001), a las 12 semanas en *Phalaenopsis* sp. en medio Murashige y Skoog (MS) al 50 %, suplementado con 20.0 mg L⁻¹ BA y 1.0 mg L⁻¹ ANA indujeron un promedio de formación de 10 a 13 PLBs.

Park *et al.* (2002), en *Daritaenopsis* (*Doritis* x *Phalaenopsis*) obtuvieron un 72.3 % de formación de PLBs, con una media de 18 PLBs por explante en un medio MS al 50 % suplementado con 1.98 mg L⁻¹ de TDZ en un tiempo de tres semanas.

Cheng y Chang (2006), promovieron un promedio de 19.4 PLBs por explante en *Phalaenopsis amabilis*, utilizando MS 50 %, 3 mg L⁻¹ de TDZ, mientras que Feria *et al.* (2007), lograron una respuesta del 91.3 % en la formación de PLBs en un periodo en oscuridad de 15 días en *Phalaenopsis*, con un medio MS al 50 % adicionado con 10 mg L⁻¹ de BA y 1.0 mg L⁻¹ de ANA.

Gow *et al.* (2008), reportaron con un medio MS al 50 % y una concentración de 3.0 mg L⁻¹ de BA la obtención de una respuesta embriogénica del 80 % en *Phalaenopsis*; en contraste Mayer *et al.* (2010), en *Oncidium flexuosum* obtuvieron un promedio de 10 PLBs por explante utilizando 0.3 mg L⁻¹ de TDZ en medio MS.

Sinha y Jahan (2011), obtuvieron una media de 15.0 ± 3.1 PLBs por explante en *Phalaenopsis*, en un medio MS al 50 % suplementado con 10 % de agua de coco, 2 % de sacarosa, 2 g L^{-1} de peptona, 1 g L^{-1} de carbón activo y una combinación de 2.0 mg L^{-1} de BA y 0.5 mg L^{-1} de ANA, así mismo Paek *et al.* (2011), reportaron un rango de formación de 28 a 32 PLBs por explante en *Phalaenopsis*, cultivados en medio Vacin and Went (VW) adicionado con 20 % de agua de coco, 3 mg L^{-1} de BA y 1 mg L^{-1} de TDZ.

Khoddamzadeh *et al.* (2011), indujeron una respuesta favorable del 78 % de los explantes con una media de 14 PLBs por explante en *Phalaenopsis belina* (Rcnb.f.) en un medio MS adicionado con 3 mg L^{-1} de TDZ, mientras que con la combinación de 1 mg L^{-1} ANA y 3.0 mg L^{-1} de TDZ indujeron una respuesta del 72 % con una media de 9 PLBs por explante. Resultados reportados por Balilashaki *et al.* (2014), quienes lograron inducir una media de 6.5 PLBs por explante en *Phalaenopsis* en un medio MS al 50 % con 3 mg L^{-1} TDZ.

2.6.3 Raíz

La utilización de explantes de raíz en orquídeas para la formación de PLBs se ha reportado por varios autores: Park *et al.* (2003), en *Daritaenopsis* (*Doritis* x *Phalaenopsis*) indujeron una respuesta de 2 a 6 PLBs y un porcentaje de formación del 47.2 % en un medio MS al 50 % con 0.50 mg L^{-1} de TDZ y 20 % de agua de coco.

Por su parte, Paek *et al.* (2011), reportaron un rango de 2 a 6 PLBs por explante en *Phalaenopsis* en un medio VW suplementado con 20 % de agua de coco, 3 mg L^{-1} de BA y 1 mg L^{-1} de TDZ, a las ocho semanas.

En otras especies de orquídeas como *Cyrtopodium pranaense* Wei-Ling *et al.* (2010), indujeron un rango de formación de PLBs del 80 al 100 % en un medio MS con 1.78 mg L⁻¹ de AIA y 1.98 mg L⁻¹ TDZ. En contraste Manners *et al.* (2010), obtuvieron una media de 16.2 PLBs por explante en *Vanda coerulea* en un medio MS con 7 mg L⁻¹ de BA y 3 mg L⁻¹ de AIA.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del experimento

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal (LBMV) del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento (CIEAF), de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex), ubicada en el Campus Universitario “El Cerrillo”, Toluca, México.

3.2 Material vegetal

Se utilizaron como explantes protocormos (PLBs) de *Phalaenopsis* sp. var. Dudu obtenidos *in vitro* a partir de semilla y explantes de secciones de hoja obtenidas de la regeneración de planta *in vitro* de la misma especie.

3.3 Inducción de protocormos (PLBs)

Para la inducción de PLBs a partir explantes de PLBs se utilizó el medio de cultivo MS al 50 %, adicionado con 20 g L⁻¹ de sacarosa, vitaminas MS, 4 g L⁻¹ de agar, 0.5 g L⁻¹ de carbón activado, RCV (1 mg L⁻¹ 2,4-D y 7 mg L⁻¹ BA), 4 concentraciones de los CO: Aguamiel y Pulque (0.00, 10.00, 50.00 y 100.00 ml L⁻¹), dando un total de 8 tratamientos. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.2 ± 0.1 con NaOH o HCL 1.0 N, antes de adicionar el agar y después se esterilizó en una autoclave a temperatura de 121 °C y a 1.1 Kg cm⁻² de presión por 20 minutos.

Para la inducción de PLBs, usando como explantes secciones de hoja se utilizó el medio de cultivo MS al 25 %, adicionando con 60 g L⁻¹ de sacarosa, vitaminas L2, 8 g L⁻¹ de agar, Fe - EDTA al 25 % y la combinación de dos RCV, 2,4-D (3, 4 y 5 mg L⁻¹) y BA (1, 2 y 3 mg L⁻¹) y 3 periodos en oscuridad (14, 21 y 28 días), dando un total de 27

tratamientos. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 ± 0.1 con NaOH o HCL 1.0 N, antes de adicionar el agar y después se esterilizó en una autoclave a temperatura de 121 °C y a 1.1 Kg cm^{-2} de presión por 20 minutos.

3.4 Condiciones de cultivo *in vitro*

En el presente trabajo de investigación, en todos los tratamientos se procuró que cada explante consistiera en una agrupación de 5 PLBs sin disgregarse.

El cultivo de los explantes de PLBs se llevó a cabo en cajas Petri, colocando diez explantes por caja, todos los tratamientos fueron incubados en completa oscuridad por 2 semanas y a una temperatura de 25 ± 1 °C.

Posterior a las 2 semanas de oscuridad, todos los tratamientos fueron incubados en condiciones de luz, con lámparas de luz blanca ($25 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}$) durante 16 horas por 6 semanas.

Se hicieron observaciones a las 8 semanas después del establecimiento (SDE) a fin de evaluar la respuesta de los explantes en cada uno de los tratamientos en relación con la formación de PLBs. Una vez formados los PLBs fueron transferidos al medio CP2 (MS al 50 %, 20 g L^{-1} de sacarosa, 10 % de agua de coco, 4 g L^{-1} de agar y 0.5 g L^{-1} carbón activado.) para el crecimiento de plántulas.

Por otra parte, para el establecimiento de los explantes de sección de hoja ($5 \text{ mm} \pm 1 \text{ mm}$), éstos fueron colocados en una solución antifenoles (MS al 50 % y 20 mg L^{-1} de ácido ascórbico) por dos horas para después colocar ocho explantes de forma adaxial por caja Petri.

Todos los tratamientos fueron incubados a una temperatura de 25 ± 1 °C y transferidos a medio fresco cada 14 días.

A fin de evaluar el efecto del periodo en oscuridad en la inducción de PLBs a partir de explantes de secciones de hoja, los cultivos se incubaron durante 14, 21 y 28 días en completa oscuridad, posteriormente todos los tratamientos fueron incubados en condiciones de luz, con lámparas de luz blanca ($25 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}$) durante 16 horas. Una vez concluidos los periodos en oscuridad se hizo el conteo de PLBs a las 6 semanas. Posteriormente los PLBs formados fueron transferidos al medio CP2 para el crecimiento de plántulas.

3.5 Evaluación de Complejos Orgánicos (CO) y Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV)

Para la inducción de PLBs a partir de explantes de PLBs se evaluó el efecto de dos CO: Aguamiel y Pulque. Los tratamientos evaluados fueron: 4 concentraciones de Aguamiel y Pulque (0.0, 10.00, 50.00 y 100.00 ml L⁻¹), dando un total de 8 tratamientos con 10 repeticiones, cada explante fue considerado como una unidad experimental.

Para la inducción de PLBs a partir de explantes de hoja se evaluó el efecto de las combinaciones de dos RCV, 2,4-D (3, 4 y 5 mg L⁻¹) y BA (1, 2 y 3 mg L⁻¹), así como 3 periodos en oscuridad (14, 21 y 28 días), dando un total de 27 tratamientos con 8 repeticiones, cada explante fue considerado como una unidad experimental.

3.6 Regeneración de plántulas *in vitro*

Para la regeneración de plántulas a partir de PLBs se utilizó el medio de cultivo CP2, el cual contenía MS al 50 %, 20 g L⁻¹ de sacarosa, 10 % de agua de coco, 4 g L⁻¹ de agar y 0.5 g L⁻¹ carbón activado.

Todos los explantes fueron incubados en condiciones de luz, con lámparas de luz blanca (25 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}$) durante 16 horas.

3.7 Variables evaluadas

Se evaluaron las siguientes variables:

- Número de PLBs por explante: se contaron los PLBs a las 8 SDE para el caso de los explantes de PLBs, para los explantes de hoja y con ayuda de un contador microbiano se contaron los PLBs por explante a las 6 semanas después del periodo en oscuridad, tomando como PLBs formados a los que presentaban una estructura esférica, sin raíces, ni primordios foliares y con aproximadamente 3 mm de diámetro.
- Número de PLBs por tratamiento: para el caso de los PLBs a partir de explantes de PLBs se obtuvo la media por tratamiento del número de PLBs formados a las 8 SDE y para los explantes de hoja la media se obtuvo a las 6 semanas después del periodo en oscuridad.
- Número de plantas regeneradas por tratamiento: se consideraron como plantas regeneradas las que presentaban dos hojas, dos raíces, y una altura entre 4 - 6 cm.

- Porcentaje de adaptación: se aplicó una regla de tres ($[\text{Número de plántulas sobrevivientes a los 21 días}] \cdot [100] / \text{Número total de plantas aclimatadas a condiciones } ex\ vitro = \% \text{ de plantas aclimatadas}$).

3.8 Análisis estadístico

Los diseños experimentales fueron completamente al azar, considerando el primero con 8 tratamientos y 10 repeticiones por cada tratamiento a la formación de PLBs a partir PLBs, y como el segundo con 27 tratamientos y 8 repeticiones por cada tratamiento a la formación de PLBs a partir de secciones de hoja. Para determinar el número de PLBs por explante se realizó en ambos experimentos un análisis de varianza bifactorial. La comparación de medias en los tratamientos se efectuó mediante la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher a un nivel de confianza de 99 %, mediante el programa estadístico StatGraphics® versión 5.0 para Windows®.

3.9 Aclimatación de plantas a condiciones *ex vitro*

Cuando las plantas regeneradas *in vitro* lograron alcanzar una altura aproximada entre 4 - 6 cm éstas se transfirieron a un domo de plástico que contenía una mezcla de corteza de pino, musgo y tepojal (1:2:1), así se mantuvieron en esas condiciones durante 21 días, realizando pequeños orificios en el domo de plástico cada 7 días para facilitar la adaptación de estas. Posteriormente cada planta regenerada se trasplantó a macetas de 4 pulgadas usando el mismo sustrato que en adaptación y después fueron transferidas a condiciones de invernadero.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Inducción de protocormos (PLBs)

Los PLBs son estructuras que poseen un alto grado de totipotencia (Real *et al.*, 2007), por lo que en micropropagación *in vitro* son usados porque pueden obtenerse en un corto periodo de tiempo, además que se pueden regenerar fácilmente en plantas completas, y bien se sabe que tienen una mejor respuesta en masa o cluster (Sujjaritthurakarn y Kanchanapoom, 2011).

En el presente trabajo de investigación se indujo PLBs a partir de dos tipos de explante: PLBs y secciones de hoja. Para las secciones de hoja se observó la inducción de PLBs en la cuarta semana, expuestos a la luz (Figura 1). Mientras para el caso de explantes de PLBs se observó la formación de PLBs desde la segunda semana, pero fue más notorio en la quinta semana después del establecimiento (SDE) cuando los protocormos tenían un diámetro de 3 mm (Figura 2).



Figura 1. Inducción *in vitro* de PLBs de *Phalaenopsis* sp. a partir de secciones de hoja en el tratamiento con 5 mg L⁻¹ de 2,4-D y 2 mg L⁻¹ de BA a la cuarta semana expuestos a la luz.

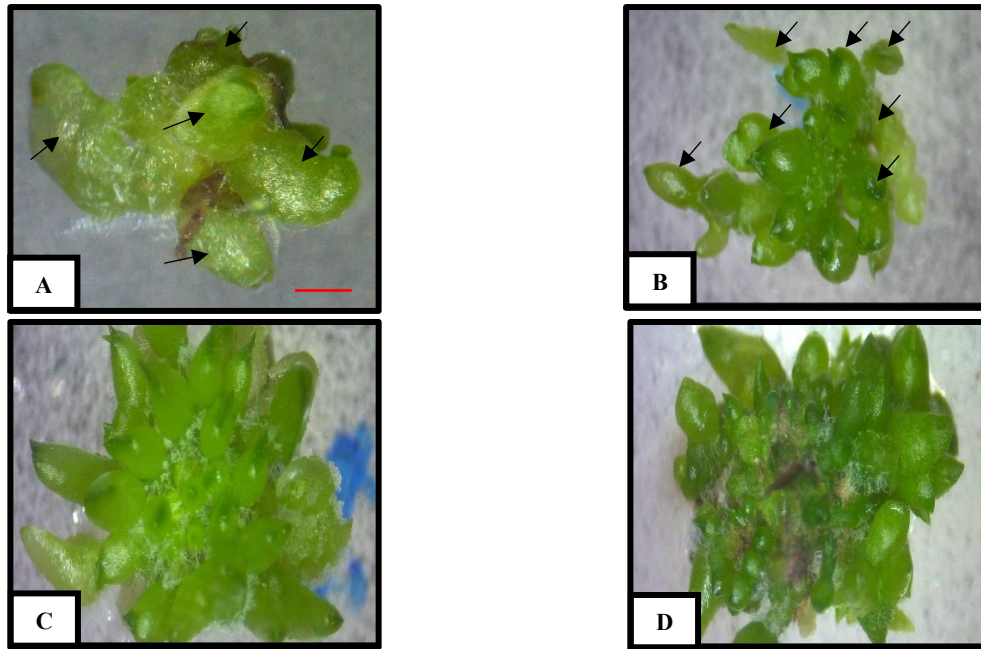


Figura 2. Inducción *in vitro* de PLBs de *Phalaenopsis* sp. a partir de explantes de PLBs con una concentración de 10 ml L⁻¹ Pulque.

A. Protocormos (PLBs) de *Phalaenopsis* sp. a las 0 SDE de 3 mm de diámetro (flechas) (Barra = 5 mm). **B.** PLBs a las 2 SDE (flechas). **C.** Proliferación de PLBs a las 5 SDE. **D.** PLBs formados a las 8 SDS.

4.2 Efecto de los complejos orgánicos sobre la inducción de PLBs a partir de PLBs

Los complejos orgánicos (CO) contiene muchas sustancias nutritivas y hormonales, por lo que son añadidos comúnmente a los medios de orquídeas para estimular la formación de protocormos debido a que tiene un efecto promotor del crecimiento y morfogénesis en una gran variedad de tejidos de la planta (Chugh *et al.*, 2009).

En investigaciones previas se ha reportado el efecto favorable de CO en la proliferación y crecimiento de PLBs. Peak *et al.* (2011), reportan un promedio de 10 a 20 PLBs en un medio VW suplementado con 3 mg L⁻¹ de BA, 1 mg L⁻¹ de TDZ y 10 % de agua de coco, mientras que Sinha y Jahan (2011), reportaron una media de inducción de 44.5 ± 3.2

PLBs por explante en un medio de cultivo MS al 50 % suplementado con 10 % de agua de coco; asimismo sin adicionar agua de coco obtuvieron una media inferior de PLBs de 20.4 ± 1.3 por explante.

Resultados similares se observaron en el presente estudio ya que al analizar los datos obtenidos en la inducción de PLBs a partir de PLBs a las 8 SDE en presencia de los complejos orgánicos (Aguamiel y Pulque) evaluados en sus 4 concentraciones (0, 10, 50 y 100 ml L⁻¹), se observó que hubo diferencias estadísticamente significativas (P= 99 %) entre los tratamientos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis de varianza para evaluar el efecto de los complejos orgánicos y sus concentraciones en la inducción de PLBs en *Phalaenopsis* sp. var. Dudu a las 8 SDE.

| Fuente | Suma de cuadrados | Gl | Cuadrado medio | Razón-F | Valor-P* |
|------------------------|-------------------|----|----------------|---------|----------|
| EFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A: Complejos Orgánicos | 911.25 | 1 | 911.25 | 19.93 | 0.0001 |
| B: Concentración | 4310.1 | 3 | 1436.7 | 31.42 | 0.0001 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| A x B | 3076.65 | 3 | 1025.55 | 22.43 | 0.0001 |
| RESIDUOS | 3292.2 | 72 | 45.725 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 11590.2 | 79 | | | |

*Nivel de confianza del 99 %

Posteriormente al realizar la prueba de comparación de medias se observó que aquellos tratamientos que contenían alguna concentración de CO fueron mejores (41.4 PLBs por explante) respecto a los tratamientos sin la adición de CO (32.4 PLBs por explante) (Cuadro 5). El agregar un CO al medio de cultivo tiene un efecto favorable en la inducción de PLBs, posiblemente debido a la gran cantidad de sustancias nutritivas que contienen, principalmente fuentes de aminoácidos (aspártico, glutámico, lisina, metionina, cisteína, etc.), carbohidratos (inulina, sacarosa, fructosa, etc.) y proteínas, los cuales pueden

desempeñar un rol importante durante la formación de PLBs y que quizá pudieron haber tenido un efecto sinérgico positivo con 7 mg L⁻¹ de BA y 1 mg L⁻¹ de 2,4-D que contenía el medio de cultivo. Resultados que contrastan con Sánchez (2015), quien reporta que la adición de un CO (Agua de coco) no favorece la inducción de PLBs (13.33 ± 8.51) en *Phalaenopsis* sp.

Cuadro 5. Prueba de comparación de medias, para evaluar el efecto del Aguamiel, Pulque y sus concentraciones en la inducción de PLBs a partir de explantes de PLBs en *Phalaenopsis* sp. var. Dudu a las 8 SDE.

| COMPLEJO ORGANICO | MEDIA | GRUPOS HOMOGENEOS |
|-------------------------------------|-------------|-------------------|
| Aguamiel | 32.0 | a |
| Pulque | 25.2 | b |
| CONCENTRACION (ml L ⁻¹) | | |
| 0 | 32.4 | b |
| 10 | 37.6 | a |
| 50 | 26.7 | c |
| 100 | 17.8 | d |
| TRATAMIENTO (ml L ⁻¹) | | |
| Aguamiel 0 | 32.4 ± 7.8 | c |
| Aguamiel 10 | 33.9 ± 5.5 | bc |
| Aguamiel 50 | 39.6 ± 10.6 | ab |
| Aguamiel 100 | 22.2 ± 5.4 | e |
| Pulque 0 | 32.4 ± 7.8 | c |
| Pulque 10 | 41.4 ± 5.7 | a |
| Pulque 50 | 13.8 ± 2.7 | e |
| Pulque 100 | 13.5 ± 5.6 | e |

No existen diferencias estadísticamente significativas entre letras iguales. Diferencia mínima significativa a un nivel de confianza del 99%.

La prueba de comparación de medias mostró que existe diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos, los tratamientos con 10 ml L⁻¹ de Pulque indujo una media de formación de 41.4 ± 5.7 PLBs por explante, 50 ml L⁻¹ de Aguamiel indujo una media de 39.6 ± 10.6 PLBs por explante y 10 ml L⁻¹ de Aguamiel indujo a su vez una media de 33.9 ± 5.5 PLBs por explante no mostraron diferencia estadísticamente significativa.

Los resultados muestran que hay diferencia estadísticamente significativa entre complejos orgánicos, siendo el aguamiel el más estable en las diferentes concentraciones de CO.

Los resultados obtenidos demuestran que aquellos tratamientos que contenían altas concentraciones de Pulque (100 y 50 ml L⁻¹) y Aguamiel (100 ml L⁻¹) mostraron medias de inducción de PLBs inferiores a los tratamientos sin la adición de un complejo orgánico (32.4 ± 7.8 PLBs), lo que sugiere que son bajas concentraciones de Pulque y Aguamiel las que ayudan a inducir un mayor número de PLBs. Estos resultados coinciden con los reportados por Sinha y Jahan (2011), ya que en los tratamientos donde no agregaron complejos orgánicos mostraron una media inferior de PLBs (20.4 ± 1.3).

4.3 Efecto de los reguladores de crecimiento (RCV) sobre la inducción de PLBs a partir de secciones de hoja

Los explantes de hoja son fáciles de obtener y no requieren el sacrificio de la planta madre y su disponibilidad no está restringida a una temporada (Chugh *et al.*, 2009).

La respuesta embriogénica *in vitro* de las orquídeas varía de acuerdo con las combinaciones y concentraciones de los RCV presentes en el medio de cultivo (Musharof *et al.*, 2013).

Al respecto, se ha reportado que las auxinas en combinación con una citocinina (BA) resulta como las mejores inductoras para la obtención de células embriogénicas (David *et al.*, 2008).

Resultados reportados por So-Young *et al.* (2001), quienes obtuvieron una media de 10 a 13 PLBs con 20.0 mg L⁻¹ de BA y 1.0 mg L⁻¹ de 2,4-D, mientras que Feria *et al.* (2007),

con 10 mg L⁻¹ de BA y 1.0 mg L⁻¹ de ANA lograron un porcentaje de inducción del 91.3 % en un periodo en oscuridad de 15 días.

Al realizar el análisis de varianza (Cuadro 6) con datos obtenidos de la inducción de PLBs a partir de explantes de hoja a las 6 semanas bajo luz, en los 27 tratamientos evaluados (9 combinaciones de RCV (3, 4 y 5 mg L⁻¹ de 2,4-D y 1, 2 y 3 mg L⁻¹ de BA) y 3 periodos de oscuridad (14, 21 Y 28 días), mostró que no existe diferencia estadísticamente significativa en los periodos en oscuridad; sin embargo la combinación de los RCV mostraron diferencias estadísticamente significativas (P= 99 %) (Cuadro 6) por lo que se realizó una prueba de comparación de medias para determinar el mejor tratamiento.

Los periodos en oscuridad son necesarios ya que los RCV son sensibles al fotoperiodo y su exposición temprana los degradaría y no daría tiempo a que actúen en la inducción de ES.

Cuadro 6. Análisis de varianza para evaluar el efecto de 9 tratamientos y 3 periodos de oscuridad en la inducción de PLBs a partir de explantes de hoja en *Phalaenopsis* sp. var. Dudu a las 6 semanas bajo luz.

| Fuente | Suma de cuadrados | Gf | Cuadrado medio | Razón-F | Valor-P* |
|--|-------------------|-----|----------------|---------|----------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A: Tratamiento | 1405.68 | 8 | 175.709 | 4.34 | 0.0001 |
| B: Periodo en oscuridad (14, 21 y 28 Días) | 117.398 | 2 | 58.6991 | 1.45 | 0.2371 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| A x B | 1985.44 | 16 | 124.09 | 3.07 | 0.0001 |
| RESIDUOS | 7649.38 | 189 | 40.4729 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 11157.9 | 215 | | | |

*Nivel de confianza del 99 %

Al realizar la prueba de comparación de medias para determinar el mejor tratamiento de la combinación de los RCV (Cuadro 7), los resultados indican que las bajas concentraciones de BA tienen un efecto negativo en la inducción de PLBs, ya que la combinación de 1 mg L⁻¹ de BA y 4 mg L⁻¹ de 2,4-D indujeron una media de 0.5 ± 1.9 PLBs por explante, en contraste con la combinación de 2 mg L⁻¹ de BA y 5 mg L⁻¹ de 2,4-D que resultó ser el mejor tratamiento en la inducción de PLBs, ya que indujo una media de 8.8 ± 11.1 PLBs por explante y un respuesta de formación de PLBs del 95 %, esto concuerda con lo reportado por Sheelavanthmath *et al.* (2005), quienes informan que las altas concentraciones de BA inducen la formación de PLBs en *Phalaenopsis* sp. Esto tal vez a que BA inhiben el efecto del control que ejerce el eje embrionario sobre el crecimiento coordinado de las células que constituyen el embrión, produciéndose un cambio en las divisiones celulares lo que daría lugar a la formación de embriones somáticos (Reyes, 2017). De igual manera debe considerarse el tamaño, edad y orientación del explante (Balilashaki *et al.*, 2014). siendo los tejidos más próximos a las zonas donde ocurre el rejuvenecimiento provocado por el proceso de meiosis, los más aptos para la iniciación de la embriogénesis somática (Reyes, 2017).

Cuadro 7. Prueba de comparación de medias, para evaluar el efecto de la concentración de citocinina (2,4-D) y auxina (BA) en la inducción de PLBs a partir de explantes de hoja en *Phalaenopsis* sp. var. Dudu a las 6 semanas bajo luz.

| TRATAMIENTO (mg L ⁻¹) | | MEDIA | GRUPO HOMOGÉNEO |
|-----------------------------------|----|------------|-----------------|
| 2,4 – D | BA | | |
| 4 | 1 | 0.5 ± 1.9 | d |
| 4 | 2 | 0.8 ± 3.0 | cd |
| 3 | 1 | 1.0 ± 2.6 | cd |
| 5 | 1 | 2.4 ± 3.2 | bcd |
| 3 | 3 | 2.9 ± 6.4 | bcd |
| 4 | 3 | 4.3 ± 8.7 | bc |
| 5 | 3 | 5.0 ± 6.1 | b |
| 3 | 2 | 5.5 ± 10.7 | ab |
| 5 | 2 | 8.8 ± 11.1 | a |

No existen diferencias estadísticamente significativas entre letras iguales. Diferencia mínima significativa a un nivel de confianza del 99%.

4.4 Aclimatación de plantas a condiciones *ex vitro*

Las plántulas obtenidas *in vitro*, fueron transferidas a un domo de plástico en condiciones de ambiente controladas por un periodo de 21 días (Figura 3). Posteriormente, cada una de ellas se trasplantó a macetas de 4 pulgadas con el mismo sustrato para luego ser transferidas a condiciones de invernadero. El porcentaje de sobrevivencia de las plántulas fue del 100 %.



Figura 3. Adaptación de plántulas a condiciones *ex vitro*

V. CONCLUSIONES

- Fue posible inducir PLBs a partir de PLBs y explantes de hoja en *Phalaenopsis* sp var. Dudu.
- El mejor tratamiento para inducir PLBs a partir de PLBs fue 10 ml L⁻¹ de Pulque.
- El periodo en oscuridad no es factor trascendental en la inducción de PLBs a partir de explantes de hoja.
- El mejor tratamiento para inducir PLBs a partir de explantes de hoja fue la combinación de 5 mg L⁻¹ de 2,4-D y 2 mg L⁻¹ de BA.
- Se logró el 100 % de adaptación de las plantas regeneradas de *Phalaenopsis* var. Dudu a partir de PLBs.
- Fue posible regenerar plantas de *Phalaenopsis* sp. a partir de PLBs en 225 días.

VI. GLOSARIO¹

Agar: Es un elemento solidificante empleado para la preparación de medios de cultivo. Se licúa completamente a la temperatura del agua hirviendo y se solidifica al enfriarse a 40 grados.

Ápice meristemático: Grupo de células fundadoras que producen nuevas estructuras por medio de la división celular, ensanchamiento y la diferenciación de las mismas.

Auxina: Son un grupo de fitohormonas que actúan como reguladoras del crecimiento vegetal. Esencialmente provocan la elongación de las células. Se sintetizan en las regiones meristemáticas del ápice de los tallos y se desplazan desde allí hacia otras zonas de la planta, principalmente hacia la base, estableciéndose así un gradiente de concentración.

Callo: Es una masa de células no diferenciadas. En las plantas las células del callo son aquéllas que cubren una herida.

Clon: Conjunto de individuos procedentes de otro, originario, por alguno de los procedimientos de multiplicación asexual.

Clonación: copia idéntica de un organismo a partir de su DNA, puede definirse como el proceso por el que se consigue, de forma asexual copias idénticas de un organismo o célula ya desarrollado.

Embrión: En botánica, el embrión es una pequeña planta en estado de vida latente o letargo. Se forma generalmente como consecuencia de la fecundación de la oófera. La doble fecundación de las angiospermas da lugar al desarrollo del embrión y del endospermo, el cuales el tejido por el cual se nutre el embrión durante la germinación.

¹ Tomados del Diccionario Akal de Términos Biológicos. Para mayor amplitud de los términos utilizados en el presente trabajo, consultar: Lawrence, E. (ed). (2003). Diccionario Akal de Términos Biológicos. Akal ediciones, España. 688 pp.

Embriogénesis somática: es la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos.

Envés: En botánica se llama envés a la cara inferior o cara abaxial de la lámina o limbo de la hoja de una planta. Casi siempre presenta una cutícula más fina, mayor densidad de estomas y, frecuentemente también, mayor abundancia de tricomas (pelos epidérmicos). Casi siempre es de color más claro que el haz.

Flexuosas: adj. Que se curva en zigzag. En botánica se refiere a partes de plantas torcidas o dobladas, dispuestas alternamente en sentidos opuestos.

Glabras: adj. Con una superficie lisa; sin pelos o vellosidades. En botánica, glabro (a) es un adjetivo usado para describir una característica morfológica como liso, brillante, no teniendo ningún pelo o cerdas o vellosidades. Es una de las claves dicotómicas de identificación de las plantas.

Haz: En botánica se llama haz a la cara superior o cara adaxial del limbo de la hoja de una planta. Tiene una cutícula algo más gruesa y posee menor abundancia de tricomas. Su color suele ser más oscuro que el del envés (como máximo pueden llegar a ser del mismo color).

Imbricado (a): Dicho de una serie de hojas o de piezas florales, que, estando muy próximas, llegan a solaparse por los bordes. En los pétalos o los sépalos de una flor, se refiere a que están dispuestos de manera que uno de ellos es totalmente externo, otro totalmente interno y los restantes tienen un borde sobre el inmediato siguiente y otro borde debajo del inmediato anterior.

Micorrizas: De origen griego, define la simbiosis entre un hongo (*mycos*) y las raíces (*rhizos*) de una planta. Es una asociación constituida por un conjunto de hifas

fúngicas (micelio) que, al entrar en contacto con las raíces de las plantas, las pueden envolver formando un manto, al mismo tiempo, las hifas se ramifican en el suelo, formando una extensa red de hifas capaz de interconectar, subterráneamente, a las raíces de plantas de la misma o de diferentes especies. Esta red de micelio permite, bajo ciertas condiciones, un libre flujo de nutrimentos hacia las plantas hospedadas y entre las raíces de las plantas interconectadas, lo que sugiere que la micorriza establece una gran unión bajo el suelo entre plantas que, a simple vista, podrían parecer lejanas y sin ninguna relación. Así, la micorriza ofrece a la planta hospedada y al ecosistema, diferentes beneficios en términos de sobrevivencia y funcionamiento.

Protocormos: Son cuerpos que se encuentran en un estado intermedio entre un embrión cigótico y un vástago, cuando estos cuerpos se forman sobre tejido adulto reciben el nombre de cuerpos protocormicos. También conocido como cuerpo tuberiforme producido tras la diferenciación embrional de la semilla de las orquídeas.

Pseudobulbos: Tallo modificado, engrosado, generalmente aéreo.

Rizoma: Tallo horizontal, generalmente sobre o dentro del sustrato.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Afonador, P.A.M. (2005). Propagación *in vitro* a partir de meristemos de cinco variedades comerciales de *Dianthus caryophyllus* L. (clavel). Tesis de licenciatura, Colombia. 137 p.
2. Ajú, U.M.M. (2009). Las orquídeas bases generales para conocimiento y enseñanza. Universidad de San Carlos de Guatemala. Tesis de Maestría, Guatemala. 78 p.
3. Arnold, S.V., Sabala, I., Bozhhov, P., Dyachok, J., Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 69: 233–249.
4. Balilashaki, K., Naderi, R., Kalatari, S., Soorni, A. (2014). Micropropagation of *Phalaenopsis amabilis* CV. Cool ‘Breeze’ with using of flower stalk nodes and leaves of sterile obtained from nodes cultures. *International Journal of Farming and Allied Sciences*. 3 (7): 823-829.
5. Breña, C.L.E., Domínguez, D.O.A., González, M.A., Esquivel, C.O., Lucio, M.H. (2010). Estrategia de exportación del pulque enlatado. Tesina para obtener el grado de Ingeniero Industrial. 158 p. México.
6. Celestino, C., Hernández, I., Carneros, E., López-Vela, D., Toribio, M. (2005). La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Invest Agrar: Sist Recur For*. 14 (3): 345-357.
7. Cheng, J.T., Chang, W.C. (2006). Directed somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf of *Phalaenopsis amabilis*. *Biologia Plantarum*. 50 (2): 169-173.

8. Chien, Kai-Wen., Chandra, A.D., Tsay, Hsin-Sheng., Chang, Chin-An. (2015). Elimination of mixed ‘Odontoglossum ringspot’ and ‘Cymbidium mosaic’ viruses from *Phalaenopsis* hybrid ‘V3’ through shoot-tip culture and protocorm-like body selection. *Crop Protection*. 67: 1-6.
9. Chugh S., Guha, S., Rao U. I. (2009). Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*. 122: 507–520.
10. David D., Gansau, J.A., Abdullah, J.O. (2008). Effect of NAA and BAP on protocorm proliferation of Borneo Scented Orchid, *Vanda hevola*. *AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol*. 18 (1): 221-224.
11. Feria, M., Chávez, M., Quiala, E. (2007). Establecimiento *in vitro* de *Phalaenopsis*. *Biotecnología Vegetal*. 7 (1) :27-33.
12. Freire, S.M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal*. 3 (4): 195–209.
13. Flores, M.A., Coyotl H.J., Hernández T.M., Velásquez J.L., Hernández A. (2006). Gestión de calidad de una miel obtenida a partir de aguamiel de maguey pulquero (*Agave salmiana*). IV Congreso Internacional XV congreso nacional de ingeniería bioquímica. México.
14. Gow, Wee-Peng., Cheng, Jen-Tsun., Chang, Wei-Chin. (2008). “Influence growth regulators on direct embryo formation from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids”. *Acta Physiol Plant* 30: 507-512.
15. Griesbach, R.J. (2002). Development of *Phalaenopsis* Orchids for the Mass-Market. *Tendencias en nuevos cultivos y nuevos usos*. 458-465.
16. <http://www.taiwanembassy.org/ES/ct.asp?xItem=549302&ctNode=12419&mp=137> (17 de noviembre de 2016).

17. Khoddamzadeh, A.A., Sinniah, U.R., Kadir, M.A., Kadzimin, S.B., Mahmood, M., Sreeramanan, S. (2011). *In vitro* induction and proliferation of protocorm-like bodies (PLBs) from leaf segments of *Phalaenopsis bellina* (Rchb.f.) Christenson. *Plant Growth Regul.* 65: 381–387.
18. Khosravi, A.R., Kadir, M.A., Kazemin, S.B., Zaman F.Q., De Silva, A. E. (2008). Establishment of a plant regeneration system from callus of *Dendrobium* cv. Serdang Beauty. *African Journal of Biotechnology.* 7 (22): 4093-4099.
19. Košir P., Škof S., Luthar Z. (2004). Direct shoot regeneration from nodes of *Phalaenopsis* orchids. *Acta agriculturae slovenica.* 83 (2): 233-242.
20. Lee Y. L. (2011). *In vitro* Culture and Germination of Terrestrial Asian Orchid Seeds. *Plant Embryo Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.* 710: 53-62.
21. Lee, E.H.E. (2007). Regeneración *in vitro* de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*. *Revista UDO Agrícola.* 7 (1): 58-67.
22. Manners, V., Kumaria, S., Tandon, P. (2010). Micropropagation of *Vanda Coerulea* Griff ex Lindl. A Study of Regeneration Competence of Roots *in vitro*. 2010 International Conference on Environmental engineering and Applications. 100-102.
23. Mayer, J.L.S., Stancato, G.C., Apezato-Da-Gloria, B. (2010). Direct regeneration of protocorm-like bodies (PLBs) from leaf apices of *Oncidium flexuosum* Sims (Orchidaceae). *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 103: 411–416.
24. Mercado, S.S.A., Amaya, N.A.Z., Barrientos, R.F. (2013). Evaluación de diferentes medios de cultivo *in vitro* en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Rev. Colomb. Biotecnol.* 15 (2): 97-105.

25. Murdad, R., Adb, L.M., Abdul, A.Z., Ripin, R. (2010). Effects of carbon source and potato homogenate on *in vitro* growth and development of Sabah's Endangered orchid: *Phalaenopsis gigantea*. *AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol.* 18 (1).
26. Musharof, M.H., Ravi, K., Pham T.V., Budi, W. Songjun, Z., Teixeira da Silva, A.J. (2013). The Application of Biotechnology to Orchids. *Critical Reviews in Plant Sciences.* 32 (2): 69-139.
27. Nava, B.R.M. (2015). Efecto de la combinación y concentración de auxina-citocina en el proceso de embriogénesis somática en *Agave angustifolia* Haw. Universidad Autónoma del Estado de México. Tesis de Licenciatura, México. 39 p.
28. Paek, K.L., Hahn, E.J., Park, S.Y. (2011). Micropropagation of *Phalaenopsis* orchids via protocorms and protocorm-like bodies. *Plant Embryo Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.* 710: 293-306
29. Park, S., Murthy, H.N., Paek, K. (2002). Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 38: 168–172.
30. Park, S., Murthy, H.N., Paek, K.Y. (2003). Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. *Plant Science.* 164: 919-923.
31. Pérez, A.A.M., (2005). Propagación *in vitro* a partir de meristemos de cinco variedades comerciales de *Dianthus caryophyllus* L. (clavel). Tesis para obtener el grado de Bióloga. Colombia. 140 p.

32. Ramírez, H.A. (2010). Evaluación del efecto prebiótico del aguamiel de maguey (*Agave salmiana*) en *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Tesis de Maestría, México. 75 p.
33. Real C. S., Moreno M.D., Menchaca G. R. A. (2007). Cultivo de protocormos de *Mormodes maculata* var. *Unicolor* L. O. Williams (orchidaceae). *Foresta veracruzana*. 9 (1): 55-58.
34. Reyes, D.J.I. (2017). Clonación de *Agave angustifolia* Haw. mediante técnicas biotecnológicas. Tesis de doctorado. 92 p.
35. Rodrigues K. F., Kumar S. V. (2009). Isolation and characterization of microsatellite loci in *Phalaenopsis gigantea*. *Conserv Genet*. 10: 559–562.
36. Runkle, E.; Wang, Yin-Tung.;Blanchard, M.; Lopez, R. (2007). Growing the best *Phalaenopsis*, part 1. Department of Horticulture, Michigan State University. 24-29.
37. Salazar, M.S.A., Amaya, N.A.Z., Barrientos, R.F. (2013). Evaluación de diferentes medios de cultivo *in vitro* en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 15 (2): 97-105.
38. Salazar, M.S.A., Orlando C.G. (2012). Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación *in vitro* de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 14 (1): 53-59.
39. Sánchez, M.A.G. (2015). Regeneración *in vitro* de plantas de *phalaenopsis* sp., a partir de PLBs (Protocorm-like bodies). Tesis de ingeniería, México. 40 pp.
40. SEDICI. (2017). Cultivo *in vitro*. Disponible en “http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2211/4_-_Cultivo_in_vitro.pdf?sequence=6”. Consultado el 25 de febrero de 2017.

41. Sheelavanthmath, S.S., Murthy, H.N., Hema, P.E., Hahn, E.J., Paek, K.Y. (2005). High frequency of protocorm like bodies (PLBs) induction and plant regeneration from protocorm and leaf sections of *Aerides crispum*. *Scientia Horticulturae*. 106: 395–401.
42. Sinha P., Firoz A.M., Lokman H.M. (2010). Micropropagation of *Phalaenopsis* Blume. Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants, *Methods in Molecular Biology*. 589: 77-86.
43. Sinha, P., Jahan, M.A.A. (2011). Clonal propagation of *Phalaenopsis amabilis* (L.) BL. Cv. 'Golden Horizon' through *in vitro* culture of leaf segments. *Blangadesh Journal of Scientific and Industrial Research*. 46 (2): 163-168.
44. So-Young P., Hosakatte N. M., kee-Yoeup P. (2001). Rapid propagation of *phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 38: 168–172.
45. Su, V., Hsu, BD., (2003). Cloning and expression of a putative cytochrome P450 gene that influences the colour of *Phalaenopsis* flowers. *Biotechnology Letters*. 25: 1933–1939.
46. Sujjaritthurakarn, P., Kanchanapoom, K. (2011). Efficient direct protocorm-like bodies induction of dwarf *Dendrobium* using thidiazuron. *Notulae Scientia Biologicae*. 3 (4): 88-92.
47. Suriyan, Cha-um., Ouk, P., Chalernpol, K. (2009). An effective *in vitro* acclimatization using uniconazole treatments and *ex vitro* adaptation of *Phalaenopsis* orchid. *Scientia Horticulturae* 121: 468–473.

48. Tan, A.M., Danial, M., Mahmood, M., Subramaniam, S. (2012). Exquisite protocol of callus induction and protocorm-like bodies (PLBs) regeneration of *Dendrobium sonia*-28. Australian Journal of Crop Science. 6 (5): 793-800.
49. Tirado, JM., Naranjo, JE., Atehortua, L. (2005). Propagación *in vitro* de *Phalaenopsis* (Orchidaceae) a partir de protocormos, mediante el sistema de inmersión temporal "RITA". Revista Colombiana de Biotecnología. 7 (1): 25-31.
50. Viñas, M., Jiménez, V.M. (2011). Factores que influyen en la embriogénesis somática *in vitro* de Palmas (Arecaceae). Revista Colombiana de Biotecnología. 13 (2): 229-242.
51. Wei-Ling, G., Yao-Chien, A.C., Chien-Yuan, K. (2010). Protocorm-like Bodies Initiation from Root Tips of *Cyrtopodium paranaense* (Orchidaceae). Hortscience. 45 (9): 1365–1368.