



Universidad Autónoma del Estado de México



Centro Universitario UAEM Tenancingo

“PROCESOS MORFOGÉNICOS EN
MICROPLANTAS DE *Laelia autumnalis*
PRECULTIVADAS EN ÁCIDO SALICÍLICO”
TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO EN FLORICULTURA

PRESENTA

STEPHANIE ELIZABETH CEBALLOS VASQUEZ

DIRECTORES

Dra. Martha Elena Mora Herrera

Dr. Rómulo García Velasco

Asesor:

Dr. Humberto Antonio López Delgado

Tenancingo, Estado de México, octubre de 2023.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Biodiversidad	3
2.1.1 ¿Qué es la biodiversidad? Importancia de la biodiversidad.....	3
2.1.2 La biodiversidad de México	3
2.2 Orquídeas.....	5
2.2.1 Género <i>Laelia</i>	5
2.2.2 <i>Laelia autumnalis</i> en la cultura indígena.....	6
2.2.3 Descripción morfológica del género <i>Laelia</i>	6
2.2.4 Hábitat del género <i>Laelia</i>	8
2.2.5 Identificación del género <i>Laelia</i>	9
2.3 Usos del género <i>Laelia</i>	9
2.4 Reproducción del género <i>Laelia</i>	11
2.5 Problemática mundial de la biodiversidad	11
2.5.1 Problemática de la familia orquidaceae	12
2.5.2 La biotecnología para la conservación de la biodiversidad	14
2.6. La biotecnología en la conservación de especies vegetales.....	14
2.6.1 Cultivo <i>in vitro</i>	14
2.6.2 El cultivo de tejidos vegetales.....	15
2.6.3 Fases del cultivo <i>in vitro</i>	16
2.6.4 Medios de cultivo.....	17
2.7 Procesos morfogénicos <i>in vitro</i>	18
2.7.1 Organogénesis.....	19
2.7.2 Embriogénesis.....	20
2.8 Reguladores del crecimiento en las técnicas <i>in vitro</i>	22
2.8.1 Auxinas.....	23
2.8.1.1 2,4- diclorofenoxiacético (2, 4-D).....	24
2.8.1.2 Ácido naftalenacético (ANA).....	24
2.8.2 Citoquininas.....	24
2.8.2.1 Bencil amino purina (BAP)	25
2.8.2.2 Thidiazuron TDZ	25
2.9 Problemas en la inducción de procesos morfogénicos en plantas	26

2.10	Ácido salicílico	27
2.10.1	El ácido salicílico como molécula de señalización en plantas	27
3.	JUSTIFICACIÓN	29
4.	HIPÓTESIS	30
5.	OBJETIVOS.....	30
5.1	Objetivo general	30
5.2	Objetivos específicos	30
6.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
6.1	Sitio experimental.....	31
6.2	Material vegetal.....	31
6.3	Condiciones del cultivo	31
6.3.1	Incubación de microplantas	31
6.4	Medio de propagación masiva de <i>L. autumnalis</i>	32
6.5	Propagación masiva de material vegetal	34
6.6	Descripción del experimento	34
6.7	Medio de preincubación con AS	35
6.8	Cultivo de microplantas con AS 0 y 10^{-5} M.....	36
6.9	Medio de inducción de procesos morfogénicos empleando auxinas y citocininas	37
6.10	Propagación del subcultivo para inducción de procesos morfogénicos empleando auxinas y citocininas	38
6.11	Variables para evaluar.....	39
7.	RESULTADOS.....	41
7.1	Efecto de auxinas y citocininas en las respuestas morfogénicas en ausencia de luz de explantes de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> precultivadas en AS	41
7.1.1	Formación de callo	41
7.1.2	Formación de órganos.....	43
7.2	Explantes sin procesos morfogénicos de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> precultivadas en AS.....	46
7.2.1	Explantes oxidados.....	46
7.2.2	Explantes verdes e incoloros.....	48
7.3	Efecto de auxinas y citocininas en las respuestas morfogénicas en presencia de luz de explantes de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> precultivadas en AS	50
7.3.1	Formación de callo	50
7.3.2	Formación de órganos.....	53

7.4	Explantos sin procesos morfogénicos de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> precultivadas en AS.....	56
7.4.1	Explantos oxidados.....	56
7.4.2	Explantos verdes e incoloros.....	58
8	DISCUSIÓN.....	61
9	CONCLUSIONES.....	66
10	BIBLIOGRAFÍA.....	67
	GLOSARIO	86

RESUMEN

México es un país megadiverso, dentro de su biodiversidad se encuentra la familia de las orquídeas, que en el Estado de México de acuerdo con la Secretaría del Medio Ambiente se han reportado 202 especies que representan el 15 % de las aproximadamente 1,260 que tiene la república mexicana. La mayoría de las especies se encuentran en alguna categoría de riesgo establecida en la NOM-059-SEMARNAT-2010, debido al saqueo indiscriminado, destrucción del hábitat, cambio del uso del suelo y contaminación ambiental.

En el sur del Estado de México *Laelia autumnalis* ha disminuido drásticamente sus poblaciones principalmente por la venta de ejemplares para diversas festividades y por destrucción de su hábitat. Ante esto y de acuerdo con el objetivo de desarrollo sostenible número 15 menciona que se deben “tomar medidas urgentes para reducir la pérdida de hábitats naturales y biodiversidad que forman parte de nuestro patrimonio común” y que está relacionado con el plan nacional de desarrollo 2020, que en su objetivo 3 menciona que se deben “incrementar las prácticas de producción sostenible en el sector agropecuario frente a los riesgos agroclimáticos” también encaminado a la conservación de la biodiversidad. Por todo esto es indispensable generar estrategias que fomenten la recuperación de los ecosistemas.

Una alternativa ante esta problemática es la biotecnología especialmente el cultivo *in vitro* que puede contribuir en forma importante a la rehabilitación de ecosistemas y paisajes degradados y asistir a los programas de conservación de especies como las orquídeas.

En este sentido, la morfogénesis es una técnica del cultivo *in vitro* que permite generar material vegetal con las características adecuadas para su restablecimiento en los ecosistemas. Esta técnica además puede ser mejorada con el uso de moléculas señal como el ácido salicílico (AS), que participa en la respuesta de tolerancia ante estrés biótico y abiótico; además participa en varias funciones fisiológicas de las plantas; por lo que el objetivo de este trabajo fue inducir procesos morfogénicos en explantes de hoja y raíz de microplantas de *L. autumnalis* precultivadas en AS, para lo cual se mantuvo una fuente permanente de material biológico de *L. autumnalis* en condiciones *in vitro*. Después las microplantas se subcultivaron

en medios Murashige y Skoog con AS 0 (testigo) y 10^{-5} M durante 2 meses. Posteriormente de esas microplantas se obtuvieron los explantes: A) hoja completa, B) raíces con ápice, C) raíces sin ápice que fueron subcultivados en medios MS con auxinas (ANA y 2,4-D) y/o citocininas (BAP y TDZ) en diferentes concentraciones y se mantuvieron en incubación en un fotoperiodo de 16 h luz y 8 oscuridad, por 4 meses. El mismo experimento se realizó en condiciones de total oscuridad. Se evaluó número de: explantes oxidados con algún proceso morfogénico (callos o brotes de *novo*), etiolados y verdes. Los resultados se reportaron en porcentajes y fueron analizados con estadística descriptiva.

Los explantes de microplantas de *L. autumnalis* precultivadas en AS e incubadas en oscuridad, mostraron menor oxidación y mayor inducción de procesos morfogénicos mediados por la auxina ANA y citocinina BAP. El explante de raíz de *L. autumnalis* es el más apto para inducir callo y brotes de *novo*, mientras que el de hoja solo para brotes de *novo*.

ABSTRACT

Mexico is a megadiverse country. Within its biodiversity is the orchid family, which in the State of Mexico, according to the Environment Department, 202 species have been reported, representing 15 % of the approximately 1,260 that exist in Mexico. Most species are in some category of NOM-059-SEMARNAT-2010, due to indiscriminate looting, destruction, land use change, and environmental contamination.

In the south of the State of Mexico, *Laelia autumnalis* populations have drastically decreased, mainly due to the sale of specimens for various festivities and the destruction of its habitat. Therefore, and under sustainable development goal number 15, which mentions that "urgent measures must be taken to reduce the loss of natural habitats and biodiversity that are part of our common heritage" and related to the 2020 national development plan, which in its objective 3, it mentions that "sustainable production practices in the agricultural sector should be increased in the face of agroclimatic risks" also aimed at the conservation of biodiversity. Because of this, it is essential to generate strategies that promote the restoration of ecosystems.

An alternative to this problem is biotechnology, especially *in vitro* culture, which can contribute significantly to the restoration of degraded ecosystems and landscapes and assist conservation programs for species such as orchids.

Morphogenesis is a *in vitro* culture technique that allows the generation of necessary plant material with the appropriate characteristics to restore ecosystems. These techniques can be improved with the use of signal molecules such as salicylic acid (SA), which participates in the tolerance response to biotic and abiotic stress; it also participates in various physiological functions of plants; Therefore, the purpose of this work was to induce morphogenic processes in leaf and root explants of *Laelia autumnalis* micro plants precultured in salicylic acid. A permanent source of biological material of *L. autumnalis* was maintained under *in vitro* conditions. The micro plants were then subcultured in MS media with AS 0 (control), or 10^{-5} M for 2 months. Subsequently, explants were obtained from these micro plants: A) completed leaves, B) roots with apex, or C) roots without apex that were sub-cultured in MS media with auxins (ANA and 2,4-D) and/or cytokinins (BAP and TDZ). in different

concentrations and were kept incubated in a photoperiod of 16 h light and 8 h dark, for 4 months. The same experiment was carried out in conditions of total darkness. The number of explants oxidized with some morphogenic process (calluses or *de novo* shoots), etiolated, and green ones were evaluated. The results were reported in percentages and analyzed with descriptive statistics.

The explants of *L. autumnalis* micro plants precultured in AS and incubated in the dark showed less oxidation and a better induction of morphogenic processes mediated by auxin ANA and cytokinin BAP. The root explant of *L. autumnalis* is the most apt to induce callus and *de novo* shoots, while the leaf explant produces *de novo* shoots.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Posición de México entre los países megadiversos, de acuerdo con: Llorente-Busquets y Ocegueda (2009 tomado de Gispert, 2010).....	4
Figura 2. <i>Laelia autumnalis</i> ilustrada en la obra de Francisco Hernández (1959 tomado de Emeterio, 2014).	6
Figura 3. A) Flor, columna y polinario de <i>Laelia autumnalis</i> (tomado de Emeterio-Lara, 2019). B) Inflorescencia, pseudobulbo, hoja y raíces de <i>Laelia autumnalis</i> (elaboración propia).....	8
Figura 4. A) Venta de manojos de <i>L. autumnalis</i> en Tenancingo, Estado de México. B) Ejemplares de <i>L. autumnalis</i> , como parte de la ornamentación de nacimiento navideño, en Tenancingo, Estado de México. C) Venta de coronas elaboradas con flores de <i>L. autumnalis</i> en el Santuario de Chalma, Estado de México (tomado de Emeterio, 2014).	10
Figura 5. Etapas de la micropropagación (tomado de Gisbert y Picó, 2015 con modificaciones)..	17
Figura 6. Rutas morfogénicas (elaboración propia).	18
Figura 7. Organogénesis en microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> (elaboración propia).	19
Figura 8. Embriogénesis somática directa a partir de explantes foliares de <i>P. amabilis</i> y <i>Phalaenopsis</i> 'Nebula'. a) Embriogénesis somática directa a partir de un explante foliar de <i>P. amabilis</i> . b) Embriogénesis somática directa a partir de un explante foliar de foliar de foliar de <i>Phalaenopsis</i> 'Nebula'. c) Varios embriones maduros derivados de hojas de <i>P. amabilis</i> . d) Plántulas de <i>P. amabilis</i> (tomado de Wee-Peng <i>et al.</i> , 2009).....	21
Figura 9. Vías de embriogénesis somática (elaboración propia).....	21
Figura 10. Clasificación de los fitorreguladores de crecimiento (tomado de Azcon-Bieto, 2020 en Hernández, 2022 con modificaciones).	23
Figura 11. Microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> regeneradas <i>in vitro</i> en el Centro Universitario UAEM Tenancingo.	31
Figura 12. Condiciones de cultivo, A) presencia de luz y B) ausencia de luz (en cámara de oscuridad).	32
Figura 13. A) Descripción de la preparación de los medios de cultivo para la propagación masiva de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> en B) en ácido salicílico y C) en auxina citocininas.	33
Figura 14. Establecimiento de la propagación masiva en microplantas de <i>Laelia autumnalis</i>	34
Figura 15. Descripción del experimento de los procesos morfogénicos en microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> precultivadas en ácido salicílico en presencia de luz y ausencia de luz.	35
Figura 16. Descripción del cultivo de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> con 0 y 10^{-5} M de AS...	37
Figura 17. Descripción del subcultivo de auxinas y citocininas de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> con 0 y 10^{-5} M de AS.	39

Figura 18. Porcentaje de formación de callos en condiciones de oscuridad de explantes de; A) hoja, B) raíz con ápice y C) raíz sin ápice, provenientes de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas.	42
Figura 19. Callos en condiciones de oscuridad de explantes de A) raíz con ápice y B) sin ápice, provenientes de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas.	43
Figura 20. Porcentaje de formación de organogénesis en condiciones de oscuridad de explantes de; A) hoja, B) raíz con ápice y C) raíz sin ápice, provenientes de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas... ..	45
Figura 21. Organogénesis en condiciones de oscuridad de explantes de hoja, provenientes de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas.	46
Figura 22. Porcentaje de oxidación en condiciones de oscuridad de explantes de; A) hoja, B) raíz con ápice y C) raíz sin ápice, provenientes de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas.	47
Figura 23. Oxidación en condiciones de oscuridad de explantes de A) hoja, B) raíz con ápice y C) raíz sin ápice, provenientes de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas.	48
Figura 24. Verde en condiciones de oscuridad de explantes de A) hoja, B) raíz con ápice y C) raíz sin ápice, provenientes de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas.	50
Figura 25. Porcentaje de formación de callos en condiciones de luz de explantes de; A) hoja, B) raíz con ápice y C) raíz sin ápice, provenientes de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas.	52
Figura 26. Callos en condiciones de luz de explantes de raíz con A) ápice y B) sin ápice, provenientes de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas.	53
Figura 27. Porcentaje de formación de organogénesis en condiciones de luz de explantes de; A) hoja y B) raíz con ápice, provenientes de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas.	55
Figura 28. Organogénesis en condiciones de luz de explantes de hoja, provenientes de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas.	56

Figura 29. Porcentaje de la cuantificación de la oxidación en condiciones de luz de explantes de; A) hoja, B) raíz con ápice y C) raíz sin ápice, provenientes de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas... 57	57
Figura 30. Oxidación en condiciones de luz de explantes de A) hoja, B) raíz con ápice y C) raíz sin ápice, provenientes de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas..... 58	58
Figura 31. Verde en condiciones de luz de explantes de A) hoja, B) raíz con ápice y C) raíz sin ápice, provenientes de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas..... 60	60

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Soluciones para el medio de cultivo Murashige y Skoog 1962 MS descrito por Mora-Herrera (2007)..... 33	33
Cuadro 2. Combinación y concentraciones de las fitohormonas (mg L^{-1}) por tratamiento, para inducir procesos morfogénicos en microplantas de <i>L. autumnalis</i> precultivadas con 0 y 10^{-5} M de AS. 38	38
Cuadro 3. Porcentaje de explantes verdes sin proceso e incoloros en condiciones de oscuridad de explantes de; A) hoja, B) raíz con ápice y C) raíz sin ápice, provenientes de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas..... 49	49
Cuadro 4. Cuantificación de verde sin proceso e incolora en condiciones de luz de explantes de; A) hoja B) raíz con ápice, y C) raíz sin ápice, provenientes de microplantas de <i>Laelia autumnalis</i> precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas... 59	59

ABREVIATURAS

2,-4D: 2,4- Diclorofenoxiacético.

ANA: Ácido naftalenacético.

AS: Ácido salicílico.

BAP: Bencil amino purina.

CONABIO: Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad.

ERN: Especies reactivas de nitrógeno.

ERO: Especies activas de oxígeno.

ES: Embriones somáticos.

ESAF: Embriogénesis somática de alta frecuencia.

ESBF: Embriogénesis somática de baja frecuencia.

KOH: Hidróxido de potasio.

MEXU: Herbario de la Universidad Autónoma de México.

MS: Medio de cultivo Murashige y Skoog.

ONU: Organización de las Naciones Unidas.

PIB: Producto Interno Bruto.

SEMARNAT: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

TDZ: Thidiazuron.

UAMIZ: Herbario de la Universidad Metropolitana.

1. INTRODUCCIÓN

México es uno de los cinco países megadiversos del mundo. Concentra entre 10 y 15 % de las especies terrestres en solo 1.3 % de su superficie. Orchidaceae es una familia de las angiospermas y taxonómicamente es más especializada de las monocotiledóneas (Luna *et al.*, 2011).

En México existen más de 1,260 especies de orquídeas, siendo el porcentaje de endemismo de 40 % de especies y 8 % de géneros (Soto *et al.*, 2007). Los estados con mayor diversidad de estas especies son: Estado de México, Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Puebla, Hidalgo, San Luis Potosí, Guerrero, Michoacán, Jalisco, Nayarit y Sinaloa. Debido a su gran diversidad morfológica y larga duración de flores, el comercio ornamental de las orquídeas se ha expandido notablemente en las últimas décadas (Soto, 1996).

Las orquídeas son de las plantas más vulnerables, debido a la sobreexplotación del medio silvestre, tráfico ilegal, pérdida de hábitat y cambio climático. Varios países desarrollados, demandan orquídeas silvestres a los países con mayor riqueza de estas plantas, tales como los ubicados entre el trópico de Cáncer y Capricornio (Swarts y Dixon, 2009). En México además se suman actividades de comercio ilegal, deforestación, cambio de uso de suelo para actividades agropecuarias y avance urbano; cambio climático acelerado por la gran concentración de carbono en la atmósfera (Nájar, 2011; Sanz, 2011).

De acuerdo con el objetivo de desarrollo sostenible 15 “vida de ecosistemas terrestres”, se deben tomar medidas urgentes para reducir la pérdida de hábitats naturales y biodiversidad que forman parte de nuestro patrimonio común (ONU, 2015).

La biotecnología es uno de los muchos recursos que pueden contribuir en forma importante a la rehabilitación de ecosistemas y paisajes degradados y asistir a los programas de conservación de especies como las orquídeas (Roldan y Garde, 2014).

Por ello se han desarrollado varios métodos de micropropagación mediante morfogénesis directa e indirecta en este género como la propagación clonal a través de cultivo de hojas,

cultivo de yemas florales, así como la inducción de callo embriogénico y el cultivo de células en suspensión (Park *et al.*, 2002).

2. ANTECEDENTES

2.1 Biodiversidad

2.1.1 ¿Qué es la biodiversidad? Importancia de la biodiversidad

La biodiversidad, es la variedad de la vida. Este concepto reciente incluye varios niveles de organización biológica: abarca a la diversidad de especies de plantas, animales, hongos y microorganismos que viven en un espacio determinado, a su variabilidad genética, los procesos ecológicos y evolutivos que se dan a nivel de ecosistemas y paisajes (CONABIO, 2022).

La biodiversidad que vemos hoy en día es el resultado de aproximadamente 4.5 miles de millones de años de evolución, influenciados cada vez más por el ser humano. Esta, también constituye una red vital de la que dependemos como fuente de: alimentos, agua, medicinas, clima estable y crecimiento económico, entre otras (ONU, 2020). Por otro lado, los ecosistemas nos generan recursos biológicos que nos nutren, nos visten y nos proporcionan alojamiento, (CEPAL-PNUMA, 2002). Más de la mitad del PIB (Producto Interno Bruto) mundial depende de la naturaleza y, de manera particular, de los bosques la subsistencia de más de mil millones de personas (ONU, 2020).

2.1.2 La biodiversidad de México

Se reconocen como países megadiversos aquellos que contienen un porcentaje extraordinario de la biodiversidad del planeta. En este caso, México es un país privilegiado por su biodiversidad y en conjunto con Brasil, Colombia e Indonesia se ubica en los primeros lugares entre los países megadiversos (Figura 1). Esto se debe a que se encuentran casi todos los tipos de ambientes naturales que se conocen sobre la Tierra (Gispert, 2010).

País	Plantas vasculares	Mamíferos	Aves	Reptiles	Anfibios
Brasil	56215	578	1712	630	779
Colombia	48000	456	1815	520	634
China	32200	502	1221	387	334
Indonesia	29375	667	1604	511	300
México	23375	535	1107	804	361
Venezuela	21073	353	1392	293	315
Ecuador	21000	271	1559	374	462
Perú	17144	441	1781	298	420
Australia	15638	376	851	880	224
Madagascar	9505	165	262	300	234
Congo	6000	166	597	268	216
Lugar de México	5	3	8	2	5

Figura 1. Posición de México entre los países megadiversos, de acuerdo con: Llorente-Busquets y Ocegueda (2008 tomado de Gispert, 2010).

Dentro de esta biodiversidad mundial se encuentra la familia de las orquídeas que es importante por los ecosistemas y por la economía subyacente a ella. Dentro de las zonas con mayor diversidad de orquídeas en el mundo destacan las regiones septentrionales de los Andes sudamericanos, las montañas del Istmo centroamericano, Madagascar, el sureste de China, así como las islas de Sumatra, Borneo y Nueva Guinea (Pupulin y Bogarín, 2004), representando 25 mil especies de orquídeas (Chase *et al.*, 2003). Orchidaceae es una familia de las angiospermas y taxonómicamente es la más especializada de las monocotiledóneas (Luna *et al.*, 2011). De las cuales en México existen más de 1,260 especies, siendo el porcentaje de endemismo de 40 % de especies y 8 % de géneros (Soto *et al.*, 2007), y concentra entre 10 y 15 % de las especies terrestres en solo 1.3 % de su superficie (Luna *et al.*, 2011).

2.2 Orquídeas

En América, México ocupa el cuarto lugar a nivel mundial de biodiversidad (Plascencia *et al.*, 2011). De los grupos taxonómicos mejor representados en la flora mexicana conocida se enlistan seis familias: Asteraceae, Poaceae, Orchidaceae, Fabaceae, Rubaceae y Cactaceae (Rzedowski, 1998), entre las que destaca la familia Orchidaceae (Llorente-Bousquets y Ocegueda, 2008). Esta diversidad en la familia se debe, entre otras cosas, a los procesos evolutivos por la presión selectiva del ambiente a través de los años (Chase *et al.*, 2003), a la adaptación a diversos ecosistemas y a las interacciones que existen con otros organismos de su entorno (Hágsater *et al.*, 2005). 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”.

Los estados con mayor diversidad de orquídeas son: Estado de México Nayarit, San Luis Potosí, Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Puebla, Hidalgo, Guerrero, Michoacán, Jalisco y Sinaloa. Debido a su gran diversidad morfológica y larga duración de flores, se ha expandido notablemente en las últimas décadas su comercio ornamental (Soto, 1996). El Estado de México ocupa el tercer lugar a nivel nacional en diversidad de especies de orquídeas (Ceballos *et al.*, 2009); en este sentido, la Secretaría del Medio Ambiente, (2010) menciona que el Estado de México, se han reportado 202 especies de orquídeas que representan el 15 % de las aproximadamente 1,260 que tiene la República Mexicana. De acuerdo con cifras que se establecen en estudios estatales por Nava (2008), Ocuilan de Arteaga es el municipio donde se encuentra la mayor diversidad con 144 especies, agrupadas en 48 géneros. Por otro lado, a partir de datos de herbario como el de la Asociación Mexicana de Orquideología (AMO), el Herbario de la Universidad Autónoma de México (MEXU) y el Herbario de la Universidad Metropolitana (UAMIZ), para el municipio de Temascaltepec se reportan 78 especies, para Tenancingo 26 y para Villa Guerrero 5, lo que refleja la riqueza de especies en el sur del Estado de México.

2.2.1 Género *Laelia*

Etimológicamente *Laelia* es dedicada a Laelia, una de las vírgenes del templo de Vesta en la mitología romana (Szeszko-Fabila, 2010). El enlace tropical de Norte, Centro y Sudamérica

puede albergar a otros géneros de importancia además de *Laelia* como: *Cattleya*, *Epidendrum* y *Encyclia*, que sobresalen como un grupo vistoso de gran atractivo en México (Lee *et al.*, 2010). *Laelia* agrupa aproximadamente 11 especies de las cuales algunas son epífitas silvestres originarias de México, y han sido reportadas en las sierras de la vertiente del Golfo de México en los Estados de México, Hidalgo, Puebla, Veracruz, Tamaulipas, Michoacán, Guanajuato, Querétaro, San Luis Potosí, Morelos, Chiapas y Oaxaca, y probablemente en Guerrero y Jalisco (Bechtel, 1990; Halbinger, 1993).

2.2.2 *Laelia autumnalis* en la cultura indígena

El nombre en náhuatl de *L. autumnalis* era chichiltepetzacuxochitl (Figura 2), cuya traducción es flor silvestre roja y pegajosa. Por otro lado, en el Estado de México y Michoacán es conocida como ahuauchitl, palabra de origen náhuatl que proviene de *auatl* que significa encino y *xochitl* que significa flor (Molina, 2004; Simeón, 2004) traducido como flor de encino (Nava, 2008; Beltrán-Rodríguez *et al.*, 2012).



Figura 2. *Laelia autumnalis* ilustrada en la obra de Francisco Hernández (1959 tomado de Emeterio, 2014).

2.2.3 Descripción morfológica del género *Laelia*

Laelia autumnalis (Lex.) Lindl., es una orquídea epífita o litófito de 50-100 cm de altura incluyendo la inflorescencia (Figura 3.B), rizoma evidente de 2-3 por 0.1-0.3 cm. Pseudobulbos bi-trifoliados (Figura 3.B), fusiformes a ovoides, cónico-ovoide a subgloboso, levemente comprimidos, sulcados longitudinalmente, color verde oscuro, con 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 2-3 oblongo-lanceoladas, a veces estrechamente elípticas a ensiformes, agudas a subagudas, 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 de largo, erecto-arqueada, en forma de racimo laxo, pedúnculo ligeramente comprimido verde con puntos morados, de 3-4 mm de diámetro, brácteas subtriangulares, escariosas, color blanco-marrón, ligeramente conduplicadas, racimo con 3-13 el raquis 8-36 cm de largo, brácteas florales triangular-ovadas, obtusas, mucronada, cubierta del ovario o divergentes de ella, marrón blanquecino, 9-21 por 7-14 mm (Halbinger y Soto, 1997, Nava, 2008; Calderón de Rzedowski y Rzedowski, 2010 en Emeterio, 2014)

Flores grandes y vistosas de 6.5 a 12 cm de diámetro, resupinadas, tépalos lila a magneto oscuro, a veces rosado a magneta 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 magneta; 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, ovario pedicelado, subterete, engrosado hacia el ápice, 6-sulcado, color verde oliva, en el base más claro, 35-46 x 3-4,5 mm; sépalos con el ápice acuminado y recurvado, extendidos (Halbinger y Soto, 1997, Nava, 2008; Calderón de Rzedowski y Rzedowski, 2010 en Emeterio, 2014)

Sépalos dorsales lanceolado a estrechamente elípticos, sépalos laterales algo oblicuos y lanceolados 38-70 por 9-17 mm, pétalos extendidos, con los ápices planos y ligeramente curvas, lanceolados a elípticos, más amplios en la parte media, márgenes enteros a ligeramente ondulados, agudo a ligeramente acuminado, de 38-67 mm x 14-27 mm; labelo trilobado, 34-48 mm de largo, 28-39 mm de ancho, parte basal recta y subparalela a la columna, lóbulos laterales erectos, oblongoelípticas, margen entero, lóbulo medio elíptico a ovado, agudo a emarginado; antera transversalmente elipsoide, de color amarilla y crema con manchas púrpura; polinario con 4 polinios ovoides-piriformes, comprimidos y amarillos, unidos a caudículas acintadas granuladas, rostelo laminar, transversalmente oblongo a semielíptico a ovado, convexo. 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 (Halbinger y Soto, 1997, Nava, 2008; Calderón de Rzedowski y Rzedowski, 2010 en Emeterio, 2014; Figura 3.A).

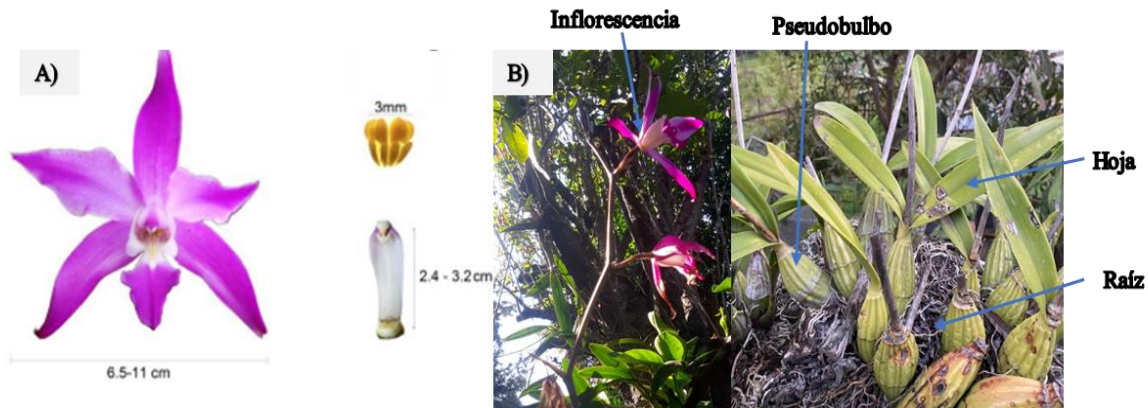


Figura 3. A) Flor, columna y polinario de *Laelia autumnalis* (tomado de Emeterio-Lara, 2019). B) Inflorescencia, pseudobulbo, hoja y raíces de *Laelia autumnalis* (elaboración propia).

2.2.4 Hábitat del género *Laelia*

El género *Laelia* 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 (Soto, 1997; Nava, 2008; Calderón y Rzedowski, 2010).

Según Szeszko-Fabila, (2010) *Laelia autumnalis* presenta hábitos de crecimiento como litofita o como epífita en bosques de encino o pino-encino. Cuando se encuentran como litofita, pueden crecer directamente sobre rocas y acantilados expuesta al sol y a fuertes vientos, pero es más común encontrarla como epífita. Con frecuencia se observa creciendo sobre encinos (*Quercus rugosa* y *Q. crassipes*) y enebros (*Juniperus flaccida*). Existen dos formas de esta especie en el Estado de México; las plantas que corresponden a la forma *autumnalis* crecen entre 1 800 y 2 300 m; las que corresponden a la forma *atrorubens* crecen en ambientes más húmedos y fríos entre 1950 y 2 600 m.

2.2.5 Identificación del género *Laelia*

Laelia autumnalis es una especie fácil de reconocer, ya que se distingue de las otras dos especies de *Laelia* que crecen en el Estado de México por su distribución geográfica y por el hecho de tener los pseudobulbos alargados con dos hojas; en cambio, como el caso de *L. speciosa* tiene pseudobulbos subglobosos con una sola hoja, mientras que *L. rebescens* presenta pseudobulbos fuertemente aplanados, también con una sola hoja. Se podría confundir con algunas especies de *Encyclia* pero estas últimas tienen pseudobulbos con un solo entrenudo, mientras que las del género *Laelia* siempre presentan dos (Szeszko-Fabila, 2010).

2.3 Usos del género *Laelia*

Las orquídeas son uno de los recursos florísticos con mayor riqueza de especies y elevado valor cultural y económico en México, que se ha utilizado desde tiempos precolombinos por grupos mesoamericanos para satisfacer diversas necesidades a través de sus usos medicinal, ceremonial, alimentario, ornato y como fuente de ingreso por la venta de ejemplares (Sahagún, 2006; Flores-Palacios y Valencia-Díaz, 2007).

Para el caso de *L. autumnalis* y de acuerdo con la coincidencia de su periodo de floración con las celebraciones de Día de Muertos también permite que su inflorescencia sea utilizada en mayor cantidad para decorar tumbas, altares, santos e iglesias principalmente en Villa Guerrero, Ocuilan y Tenancingo, Estado de México. En el caso de diciembre se observa mayor demanda para la decoración de nacimiento navideños, así como también la venta de coronas con flores de para los peregrinos que llegan al santuario de Chalma, Estado de México (Figura 4; Emeterio, 2014).



Figura 4. A) Venta de manojos de *L. autumnalis* en Tenancingo, Estado de México. B) Ejemplares de *L. autumnalis*, como parte de la ornamentación de nacimiento navideño, en Tenancingo, Estado de México. C) Venta de coronas elaboradas con flores de *L. autumnalis* en el Santuario de Chalma, Estado de México (tomado de Emeterio, 2014).

Laelia autumnalis es una de las especies de orquídeas comercializadas desde tiempos prehispánicos según los documentos históricos, donde la incluyen como aglutinante (Sahagún, 1975), y medicinal para atender hemorragias, heridas, disentería, inflamaciones y fiebre (Hernández, 1959 en Emeterio, 2014). No obstante, en la actualidad el uso de orquídeas como aglutinante ha desaparecido y con ello en el nombre común de la planta que hacía referencia a dicha propiedad (Emeterio-Lara *et al.*, 2016).

Emeterio-Lara y colaboradores (2016), mencionan que en sur del Estado de México, el uso ornamental ocupa el primer lugar particularmente para la decoración de nacimientos navideños. El uso medicinal ocupa el segundo lugar ya que *L. autumnalis* se usa por sus propiedades antihemorrágicas y antiabortivas. El uso de esta especie hace que sea sobreexplotada, por lo que han disminuido sus poblaciones en los ambientes naturales, de ahí la importancia de tomar acciones biotecnológicas para su preservación.

2.4 Reproducción del género *Laelia*

Las orquídeas, pueden propagarse de forma sexual y asexual. La reproducción sexual requiere la polinización de la flor por parte de insectos, los cuales suelen ser específicos para algunas orquídeas y que han evolucionado para polinizar una determinada especie o un determinado género de orquídeas, también se suele realizar la polinización manual sin la presencia del insecto, sin embargo, se requiere gran destreza y habilidad para lograrlo (Endara *et al.*, 2010b). La forma asexual es menos frecuente en la naturaleza, pero es utilizada por cultivadores particulares y en pequeños programas de reforestación, que consiste en la división del rizoma de la planta madre y el crecimiento de las secciones divididas por separado (Zeng *et al.*, 2014).

En el caso de *L. autumnalis*, como en la mayoría de las orquídeas, se puede hacer una multiplicación asexual a través de la separación de los pseudobulbos. Debido a la forma de crecimiento, comúnmente generan un nuevo pseudobulbo año. Es posible multiplicarlas cuando la planta tiene un número grande de pseudobulbos, los cuales se pueden separar para obtener una nueva planta (Menchaca y Moreno, 2011), o a través de técnicas biotecnológicas como el cultivo de segmentos vegetativos (explantes; Arditti, 1977; Sheehan, 1983; Sagawa y Kunisaki, 1984; Chin-Chi Lin, 1986).

Halbinger y Soto (1997) mencionan que las flores del género *Laelia* en México muestran características asociadas a marcados síndromes de polinización, con flores muy similares encontradas en especies lejanamente relacionadas, siendo el síndrome más obvio el de la polinización por abejas carpinteras (p.e segmentos rígidos, tépalos ondulados de apariencia barnizada, columna presionada a la superficie del labio, labio con un color más pálido que los tépalos, antera bilobada) que se encuentra en algunas *Cattleyas* bifoliadas brasileñas como *Schomburgkia* y *Myrmecophila*.

2.5 Problemática mundial de la biodiversidad

El objetivo 15 de desarrollo sostenible “vida terrestre y ecosistemas” establece que: “se deben tomar medidas urgentes para reducir la pérdida de hábitats naturales y biodiversidad que forman parte de nuestro patrimonio común”. Y se hace necesario proteger, restablecer y

promover el uso sostenible de los ecosistemas terrestres, gestionar sosteniblemente los bosques, luchar contra la desertificación, detener e invertir la degradación de las tierras y detener la pérdida de biodiversidad; además, la flora es fundamental para mitigar el cambio climático (ONU, 2015). Así como también de acuerdo con el Plan Nacional de Desarrollo en el objetivo 3 establece que “se deben incrementar las prácticas de producción sostenible en el sector agropecuario frente a los riesgos agroclimáticos”, donde se atiende el problema de los altos riesgos agroclimáticos en la actividad agropecuaria por la sobreexplotación de los recursos naturales, que se manifiesta en suelos agrícolas deteriorados, mantos acuíferos sobreexplotados y reducción de la biodiversidad, lo que deriva en un deterioro de la naturaleza y afecta la producción y productividad de alimentos. (Diario Oficial de la Federación, 2020).

El actual empobrecimiento de la biodiversidad es en gran el resultado de la actividad humana (CEPAL-PNUMA, 2002). La estructura y el funcionamiento de los ecosistemas del mundo han cambiado más rápidamente en la segunda mitad del siglo pasado que en ningún otro periodo de la historia en la humanidad. Los cambios de uso de suelo debido a la expansión de las actividades agrícolas y ganaderas, el crecimiento de las ciudades y su alto consumo de recursos (agua, electricidad, alimentos, etc.), así como la construcción de infraestructura (presas, caminos, autopistas, puentes, etc.), han provocado altas tasas de deforestación y con ello la pérdida de biodiversidad (Gispert, 2010). Por otro lado, hasta un millón de especies están amenazadas por el riesgo de extinción, siendo para muchas de ellas cuestión de décadas (ONU, 2020) lo que constituye una grave amenaza para el desarrollo humano (CEPAL-PNUMA, 2002).

2.5.1 Problemática de la familia orquidaceae

Dentro de la familia Orchidaceae, algunas especies se encuentran amenazadas o en peligro de extinción, debido al saqueo indiscriminado, destrucción, cambio del uso del suelo, y contaminación ambiental (Dutra *et al.*, 2008). Además, las orquídeas, se ubican entre las plantas más vulnerables, debido a la sobreexplotación del medio silvestre, tráfico ilegal, pérdida de hábitat y cambio climático. Varios países desarrollados, demandan orquídeas silvestres a los países con mayor riqueza de estas plantas (Swarts y Dixon, 2009). México no

escapa a esta problemática (Nájar, 2011; Sanz, 2011); ya que las orquídeas son apreciadas debido a sus floraciones de larga duración y variedad de características morfológicas (Endara *et al.*, 2010a), lo que ha provocado que algunas especies se encuentren en peligro de extinción (Halbinger, 1993) y estén incluídas en la NOM-059-SEMARNAT-2010.

La Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, registra más de 2,600 especies de flora y fauna en categoría de riesgo, de la cuales 186 especies correspondientes a la familia Orchidaceae. Szeszko-Fabila (2010), menciona que si bien *Laelia autumnalis* aún no está clasificada por la SEMARNAT como especie amenazada, las poblaciones se han visto notoriamente deterioradas por la extracción de ejemplares sobre todo en el sur del Estado de México para la comercialización ilegal, 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 tardada dado que requieren alrededor de siete años desde la germinación hasta el desarrollo de la primera flor.

Otros problemas de la especie *Laelia autumnalis* es que es extraída y comercializada como planta completa o secciones de los pseudobulbos, incluyendo en el que se desarrolla la inflorescencia, plantas y/o secciones de plantas y se venden para su uso en festividades religiosas o como plantas ornamentales (Halbinger y Soto, 1997; Flores-Palacios y Valencia-Díaz, 2007; en Emeterio-Lara *et al.*, 2016). Esta situación se agrava porque la especie tiene una baja tasa de propagación (Martin y Pradeep, 2003), lento crecimiento y baja tasa de germinación en condiciones naturales (Roldán y Garde, 2014), pues al igual que las demás orquídeas sus semillas carentes de endospermo poseen baja capacidad de germinación (1 a 5 %), relacionada con la obligatoria asociación micorrízica (Martin y Pradeep, 2003; kaur y Bhutani, 2013). Esta asociación suele ser muy específica y muchas semillas germinan en presencia de un hongo en particular que dependerá de la orquídea y el hábitat de donde provenga (Novak *et al.*, 2014). Así como también la dificultad de propagar masivamente orquídeas (Chugh *et al.*, 2009). Por ello Knudson (1922), desarrolló un método para la germinación asimbiótica de las semillas, que consistió en colocar azúcares, nutrientes, gelificantes y las semillas en un frasco de vidrio, con la presencia de estos elementos, no se requerían la simbiosis del hongo.

El proceso de germinación asimbiótica, se utiliza como método básico de producción de plantas a gran escala (Huang *et al.*, 2014). Por su parte la micropropagación, puede tener distintos objetivos como son: comercialización ornamental, producción de nuevas variedades, conservación *ex situ* y reintroducción de especies a ambientes naturales (Arditti, 2008). Las desventajas de este método son el largo tiempo que lleva hasta la obtención de ejemplares adultos que va de 3 a 5 años (Zeng *et al.*, 2016) y todos estos problemas hacen que estas plantas alcancen elevados costos en su comercialización (Chugh *et al.*, 2009).

2.5.2 La biotecnología para la conservación de la biodiversidad

La biotecnología es uno de los muchos recursos que puede contribuir en forma importante a la rehabilitación de ecosistemas y paisajes degradados (ONU, 1992); además contribuye al mejoramiento genético (Pérez, 2021) y favorece a los programas de conservación de especies como las orquídeas (Roldán y Garde, 2014).

Luna *et al.* (2011), mencionan que la biodiversidad se encuentra en crisis debido a la pérdida acelerada de especies y a la falta de conciencia sobre su conservación, por lo que, es prioritario el planteamiento de propuestas generales de acción que consideren la conservación de la biodiversidad; y de acuerdo con la ONU (2020), la mejor estrategia de conservación es la preservación del medio natural. Por otro lado, Hágsater y Stewart (1986) aseguran que a partir de 1998 se han extinguido más de 20 especies de orquídeas principalmente por sobrecolecta de sus poblaciones, además de la poca o nula aplicación de la legislación, política ambiental y la falta de esquemas para la participación de las comunidades en actividades de conservación (Menchaca-García y Moreno-Martínez, 2011). Por estos motivos, es importante implementar estrategias complementarias de conservación de biodiversidad; y entre ellas se incluye el uso de la biotecnología (Roldán y Garde, 2014).

2.6. La biotecnología en la conservación de especies vegetales

2.6.1 Cultivo *in vitro*

Desde hace algunas décadas el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales ha demostrado su utilidad en la propagación de especies amenazadas, porque ofrece la posibilidad de multiplicar plantas

a escalas mayores que las obtenidas a través de los procedimientos tradicionales (Rao, 1998; Murthy y Pyati, 2001; Lee y Lee, 2003; Shimura y Koda, 2004).

Además, el cultivo *in vitro* ofrece trabajar simultáneamente con especies emparentadas (por ejemplo, del mismo género) que no están amenazadas y donde la disponibilidad de material no esté limitada, para generar protocolos que puedan ser empleados con pequeñas modificaciones en otras especies (Menchaca-García y Moreno-Martínez, 2011).

2.6.2 El cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, como técnica, consiste esencialmente en aislar una porción de la planta, llamada explante, y proporcionar artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células allí contenidas expresen su potencial intrínseco o inducido hasta formar un nuevo órgano o una nueva planta, adoptando siempre procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana (Sánchez *et al.*, 2019).

El trabajo en cultivo de tejidos vegetales *in vitro* puede cubrir un amplio rango de actividades; por ejemplo, desde la investigación básica sobre los procesos bioquímicos y morfológicos de la diferenciación celular, hasta la que realizan aquellos laboratorios que se dedican a la investigación aplicada y al desarrollo de tecnologías, como lo es la propagación clonal y el mejoramiento genético de las plantas, es decir, la separación del explante y las actividades relacionadas con su incubación *in vitro*, dependerá en gran medida del tipo de explante y del sistema de cultivo que se emplee, los que a su vez estará en función del objetivo planteado (Sánchez *et al.*, 2019).

El cultivo de tejidos vegetales es una excelente herramienta de conservación *ex situ*, siendo las semillas el material de propagación adecuado cuando se trata de conservar la mayor diversidad genética de una población (Flores-Escobar *et al.*, 2008). Sin embargo, las semillas de orquídeas se caracterizan por ser diminutas y carecer de endospermo, por tal razón existen numerosos trabajos sobre la germinación de semillas de orquídeas en cultivo *in vitro* (Barrera *et al.*, 2005; Ávila-Díaz y Salgado-Gaciglia, 2006; Suárez-Quijada *et al.*, 2007; Flores-Escobar, 2008; Ruíz *et al.*, 2008; Ávila-Díaz *et al.*, 2009).

La aplicación de los cultivos de tejidos en la última década se ha encaminado hacia la obtención de protocolos para la eliminación de patógenos, aspecto que ha conllevado al cultivo de tejidos vegetales *in vitro* a tener una importancia preponderante en la conservación de especies o germoplasma y la producción de material vegetal libre de bacterias, hongos y virus (Sánchez *et al.*, 2019).

2.6.3 Fases del cultivo *in vitro*

De acuerdo con Gisbert y Picó (2015), la micropropagación está conformada por las siguientes etapas: 1) selección de la planta madre, donde antes de iniciar el protocolo de micropropagación las plantas seleccionadas se analizan para determinar su estado sanitario y descartar que sean portadoras de virus u otras enfermedades, que afecten al cultivo. Si este fuera el caso, se procede al saneamiento del material; 2) establecimiento del cultivo *in vitro*, para el establecimiento del cultivo de una planta sana, procedente de un cultivo de campo o de invernadero, se desinfectarán las yemas de la planta de partida antes de su introducción en recipientes con medios de cultivo que permitirán su desarrollo. Si la desinfección no se realiza correctamente, en el medio de cultivo aparecerán hongos y/o bacterias, por lo cual se deberá modificar las condiciones de desinfección; 3) multiplicación, a partir de la planta cultivada *in vitro* se puede obtener yemas, que cultivadas en el medio de cultivo nos generarán nuevas plantas. Si al medio de cultivo se le añaden auxina/citoquininas, se generarán nuevos brotes que aumentarán la tasa de multiplicación, también se puede optar por protocolos de regeneración adventicia en la cual se pueden utilizar distintos explantes en los que se formaran organogénesis o embriogénesis; y 4) enraizamiento y aclimatación, donde se requiere la transferencia de las plantas a un medio de cultivo distinto que contenga reguladores de crecimiento, y que induzca la formación de las raíces. En algunos casos las plantas no enraizadas en la fase multiplicativa pueden enraizarse durante el proceso de aclimatación. Las plantas enraizadas necesitan de un proceso de aclimatación que es clave para concluir con éxito el proceso de propagación, la cual consiste en el cambio de condiciones ambientales y nutricionales de manera paulatina, para que la planta vaya aumentando su capacidad fotosintética, ejerza la regulación estomática y se vaya fortaleciendo. Tras este proceso, se podrá cultivar la planta en condiciones estándar de campo o invernadero (Figura 5).



Figura 5. Etapas de la micropropagación (tomado de Gisbert y Picó, 2015 con modificaciones).

2.6.4 Medios de cultivo

Para el cultivo *in vitro* es importante el medio de cultivo, el cual contiene los componentes necesarios para el establecimiento y el desarrollo de las microplantas. El medio básico propuesto por Murashige y Skoog (1962), es el más utilizado, el cual consta de forma general por: macronutrientes, micronutrientes y vitaminas, se pueden adicionar reguladores de crecimiento, fuentes de carbono (azúcar), un gelificante (agar, phytigel gelrite, gelzan) y en algunos casos antioxidantes. Debido a que pueden desarrollarse organismos patógenos en el medio, antes de ser utilizado debe ser esterilizado en una autoclave, a 120 ± 1 °C con una presión de 1,5 atm y un tiempo de exposición de entre 15 y 20 minutos, (Levitus *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2019).

Una herramienta *in vitro* muy utilizada para generar materiales vegetales es la morfogénesis (Lema y Kulus, 2014). Donde el éxito de esta técnica depende tanto de la totipotencia de las células somáticas para la regeneración de plantas completas, como de otros factores como la

edad de la plántula, el tipo de explante o los reguladores de crecimiento que se suelen emplearse para obtener la respuesta morfogénica a partir de los explantes. La regeneración de plantas se puede conseguir a través dos rutas distintas: la embriogénesis somática y la organogénesis (Baleriola, 2018).

2.7 Procesos morfogénicos *in vitro*

Los eventos morfogénicos probablemente pueden ser logrados en todas las especies de plantas si se proveen las condiciones ambientales, el explante y medio de cultivo apropiados (Sánchez *et al.*, 2019).

La morfogénesis (del griego “morfo” significa forma y génesis, significa origen; Dimensiones de la vida humana, 2013), se define como la formación o la génesis de órganos y comprende el crecimiento y la diferenciación celular. En células o tejidos cultivados *in vitro* el proceso morfogénico puede inducirse ya que, las células vegetales son capaces bajo determinados estímulos de desdiferenciarse y diferenciarse de nuevo, a esta plasticidad celular se conoce como totipotencia. La respuesta morfogénica somática puede manifestarse siguiendo dos rutas alternativas: la organogénesis o la embriogénesis (Gisbert, 2011) y estas pueden ser directas o indirectas a través de la formación de un callo (Figura 6; Sánchez *et al.*, 2019).

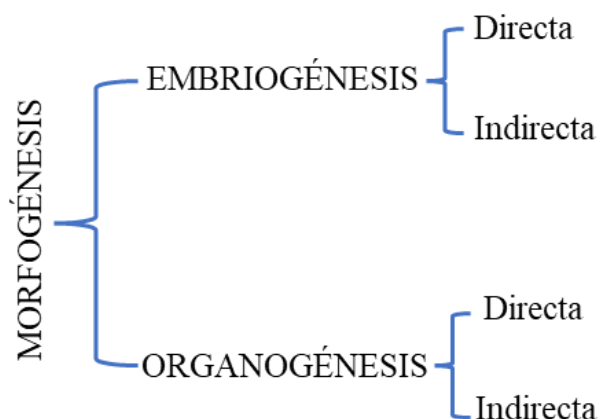


Figura 6. Rutas morfogénicas (elaboración propia).

2.7.1 Organogénesis

La organogénesis es una de las vías morfogénéticas en la cual se diferencian meristemos a partir de las células o tejidos cultivados. Cuando se produce un meristemo apical su desarrollo da lugar a una planta (Sánchez *et al.*, 2019). Es por ello que la regeneración *in vitro* es de gran importancia para el desarrollo de la organogénesis, la cual hace referencia a la capacidad de las células vegetales que se encuentran en el explante para reprogramar su desarrollo hacia la formación de tejidos y órganos nuevos que constituyen una planta (Smith, 2012). La organogénesis requiere que las células susceptibles de esta reprogramación genética sean competentes (epigenéticamente hablando), y por ende receptivas a procesos de desdiferenciación y diferenciación celular (Thorpe, 2014), que permitirán el desarrollo de meristemos, yemas y brotes adventicios hasta la obtención de una plántula completa (Mathur y Koncz, 2005).

Existen dos vías para la obtención de brotes por organogénesis; A) directa donde las células de un órgano o tejido aislado se diferencian en otro tipo de tejidos. A partir de estos se forman órganos (raíces o brotes) o individuos completos (proembriones o embriones); B) indirecta, donde las células y/o los tejidos que se aíslan de una porción organizada de la planta, se desdiferencian y forman una masa de células o callo (Figura 7; Alva *et al.*, 2010).

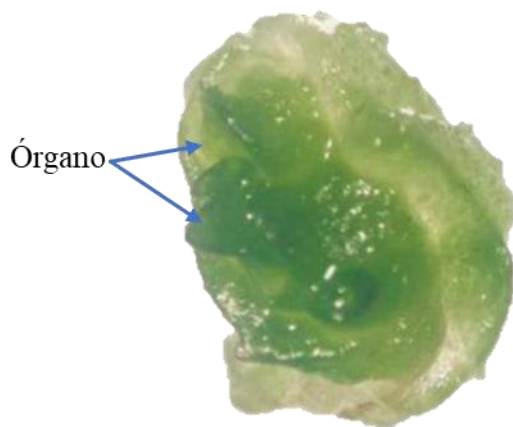


Figura 7. Organogénesis en microplantas de *Laelia autumnalis* (elaboración propia).

2.7.2 Embriogénesis

La embriogénesis somática puede definirse, como el proceso a través del cual las células somáticas se pueden diferenciar en embriones somáticos (Sánchez *et al.*, 2019; Gisbert, 2011).

Existen dos vías para la obtención de brotes por embriogénesis: A) directa donde ofrece la posibilidad de obtener embriones somáticos directamente desde células aisladas o grupos de células sin la formación de callo (Figura 8). Este desarrollo directo es debido a la acción realizada por la composición del medio de cultivo y el origen del explante; B) indirecta, en la cual existen dos tipos de embriogénesis somática indirecta, una conocida como embriogénesis somática de baja frecuencia (ESBF) donde el número de callos con embriones somáticos es mayor, aunque se forman pocos embriones somáticos por callo. Estos embriones aparecen entre las 12 y 14 semanas de cultivo, aislados o en pequeños grupos, y evolucionan completamente hasta las etapas avanzadas de desarrollo; y otra denominada embriogénesis somática de alta frecuencia (ESAF) donde los embriones somáticos aparecen entre las 16 y 20 semanas de cultivo, no se desarrollan completamente y se mantienen en estado globular, agrupados en un número mucho mayor, aunque dichos grupos aparecen en un número menor de callos (Figura 9; Freire, 2003).

Para muchos cultivos una característica común de la embriogénesis somática indirecta de alta frecuencia es la presencia de un tejido embriogénico que se diferencia a partir de células individuales llamadas células embriogénicas madres. Otra característica general de estos sistemas es la aproximación secuencial durante las fases iniciales del cultivo, debido a la alta relación auxina/citoquinina durante la división celular y la baja relación entre estos componentes durante la fase de diferenciación (Sondahl *et al.*, 1991).

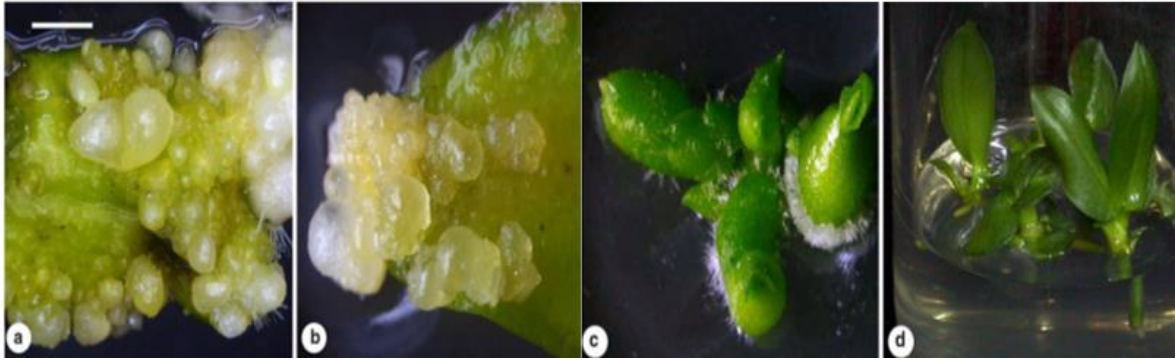


Figura 8. Embriogénesis somática directa a partir de explantes foliares de *P. amabilis* y *Phalaenopsis* 'Nebula'. a) Embriogénesis somática directa a partir de un explante foliar de *P. amabilis*. b) Embriogénesis somática directa a partir de un explante foliar de foliar de foliar de *Phalaenopsis* 'Nebula'. c) Varios embriones maduros derivados de hojas de *P. amabilis*. d) Plántulas de *P. amabilis* (tomado de Wee-Peng *et al.*, 2009).

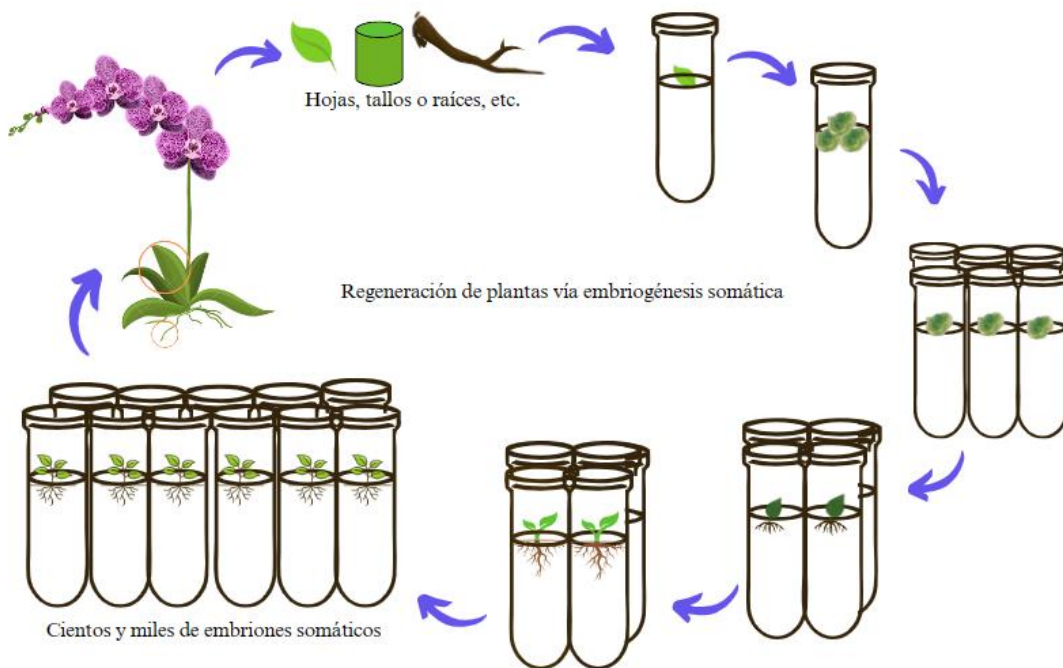


Figura 9. Vías de embriogénesis somática (elaboración propia).

La embriogénesis somática es una importante aplicación del cultivo de tejidos vegetales, que permite la propagación masiva mediante la regeneración de ES (estructuras bipolares, independientes del tejido original) con alta capacidad reproductiva (George y Sherrington, 1984). Se han desarrollado numerosos protocolos de embriogénesis somática en orquídeas, a partir de diferentes tipos de explante, tales como: yemas axilares, ápices, secciones de hoja

y semillas fecundadas e inmaduras (Chen y Chang, 2000, 2003, 2004b; Huan *et al.*, 2004), e incluso se ha logrado la inducción de embriogénesis somática repetitiva en *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa shimadzu* (Chen y Chang, 2004a).

La regeneración de orquídeas a partir de callo, normalmente se desarrolla a través de la formación de estructuras evidentemente embriogénicas denominadas cuerpos parecidos a protocormos (PLB, por sus siglas en inglés). Sin embargo, la embriogénesis somática en cultivos de callos de orquídeas es todavía limitada (Huan *et al.*, 2004). Se ha investigado la germinación *in vitro* de semillas de diferentes especies del género *Laelia* que incluyen a *L. albida* (Santos-Hernández *et al.*, 2005), *L. rubescens* (Potisek *et al.*, 1996), *L. autumnalis* (Ávila-Díaz y Salgado-Garciglia, 2006).

En los procesos morfogénicos son indispensables las hormonas vegetales (fitohormonas) que son sustancias orgánicas producidas por las plantas que se encuentran a muy baja concentración, se sintetizan en determinado lugar de la planta y se translocan hacia otras partes de esta misma (Lluna, 2006); intervienen en la fisiología de la planta, modulando sus funciones, particularmente multiplicación y elongación de las células, la floración y el crecimiento (Bedoya y Ríos, 2010).

2.8 Reguladores del crecimiento en las técnicas *in vitro*

Son considerados compuestos naturales o sintéticos que afectan los procesos metabólicos (Rademacher, 2017). Estos reguladores del crecimiento se dividen principalmente en auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico (Novak *et al.*, 2014), etileno, poliaminas, jasmonatos, brasinoesteroides, ácido salicílico y hormonas polipeptídicas, entre otros (Aspiazu, 2014). Estos inducen la formación de tejidos radiculares, tejidos estructurales, tejidos de elongación y efectos inhibidores y pueden ser utilizados solos o en combinación, dependiendo de la estructura que se requiera inducir (Novak *et al.*, 2014).

La presencia de hormonas en distintos estratos en las células y plantas, les brindan la viabilidad necesaria para desarrollar diferentes caminos morfogénicos alternativos, los cuales se dan de acuerdo con el nivel de ontogenia. Lo más común es que se presente división y elongación celular en las células vegetales por efecto de varias de estas hormonas; no

obstante, en condiciones *in vitro*, se ha llegado a visualizar que dichas células bajo ciertos niveles hormonales comienzan procesos de diferenciación (Figura 10; Aspiazu, 2014).

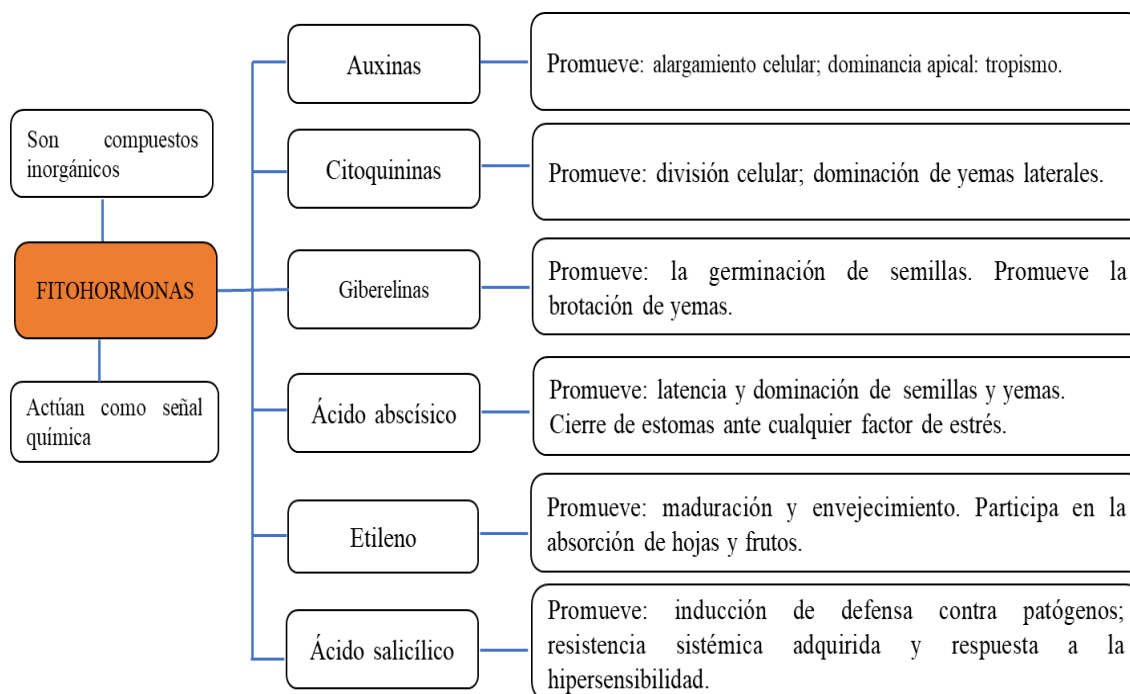


Figura 10. Clasificación de los fitorreguladores de crecimiento (tomado de Azcon-Bieto, 2020 en Hernández, 2022 con modificaciones).

2.8.1 Auxinas

Las auxinas son fitohormonas que permiten la elongación de las células, estiramiento del tejido, división celular, formación de raíces adventicias, inhibición de la formación de ápices axilares y adventicios, iniciación y crecimiento de callos y la inducción de embriogénesis somática (Novak *et al.*, 2014; Sánchez *et al.*, 2019) y se encuentran en mayor concentración en los puntos apicales de la planta y en los períodos de crecimiento, como el ácido naftalenacético (NAA), el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido indol butírico o el ácido indolacético (IAA), entre otros. Estas tienden a desarrollar las raíces adventicias y están presentes en el desarrollo temprano de los individuos, desde la formación hasta germinación del embrión (Novak *et al.*, 2014).

2.8.1.1 2,4- diclorofenoxiacético (2, 4-D)

De acuerdo con Dudits *et al.* (1991), 2,4-D es la auxina más utilizada para la inducción de embriogénesis somática, así como también en presencia de citocininas (Sagare *et al.*, 2000).

Chen y Chang, (2000) reportaron el uso de esta auxina sola y en combinación con citocininas, como es el caso de 2,4-D en combinación con TDZ para inducir callo embriogénico. Por otro lado, Pérez *et al.* (2013), reportan que se obtuvo el mayor número de embriones somáticos en medio de cultivo con 2,4-D en el cultivo de soya.

2.8.1.2 Ácido naftalenacético (ANA)

El ácido α -naftalenacético (ANA), una auxina sintética, se utiliza ampliamente en horticultura para estimular la formación de raíces adventicias (Chen *et al.*, 2002). Chen y Chang, (2000) evaluaron ANA en combinación con Thidiazuron (TDZ), en explantes de hoja y ápices con raíz, para promover la formación de embriones somáticos a partir del callo. Por otro lado, la combinación BAP con ANA, indujo la mejor respuesta morfogénica para la multiplicación eficiente de embriones somáticos. Sarabia-Ochoa, (2010) reporta que la adición de ANA y BAP para inducir brotes en *Laelia speciosa*, *Cattleya máxima* y Villanueva *et al.* (2013) en *Cattleya rex*.

2.8.2 Citoquininas

Las citoquininas o citocininas, actúan al promover la división celular, estimular la proliferación de ápices adventicios y axilares, regular la diferenciación, inhibir la formación de raíces, y estimular la actividad proteica y enzimática (Chung *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2019). Además, se utilizan principalmente en la inducción de organogénesis y embriogénesis, regulan procesos como la fotosíntesis, la senescencia, la apoptosis y la resistencia a patógenos. Entre estas se encuentran la kinetina (KIN), 6-bencilaminopurina (BAP), el thidiazuron (TDZ) o el 2iP (2 Isopentil-adenina; Chung *et al.*, 2005).

Cazarez *et al.* (2016) reportan en su estudio que BAP fue la que mostró el mayor promedio de plántulas por explante, para la formación de brotes ya que favoreció el desarrollo de hojas y raíces nuevas y fue la que mostró el mayor desarrollo de hojas y raíces nuevas.

2.8.2.1 Bencil amino purina (BAP)

Bencil amino purina (BAP) es una fitohormona o de síntesis (Meza, 2013) que participa y promueve la división de las células vegetales; sin embargo, es importante mencionar que su efecto se encuentra sujeto al estado de diferenciación celular, induciendo el desarrollo de brotes y raíces y la formación de órganos, formación de yemas en hojas separadas en las plantas y musgos, inducción de partenocarpio (Rodríguez *et al.*, 2012, Meza, 2013), además de estimular la fotosíntesis, respiración y participa en procesos importantes como la senescencia (Schiller y Magnitskiy, 2019).

Según Meza (2013), BAP en concentraciones adecuadas de auxinas provocan un crecimiento en forma de callosidad; al respecto, Gil *et al.* (2019) reportan que con BAP se obtuvo el mayor porcentaje de callos en *Cattleya trianae*. Quiroz *et al.* (2017) reportan que favorece la formación de protocormos en la orquídea *Chloraea crispa*, bajo condiciones de oscuridad. También se reportó que indujo mayor desarrollo de yemas axilares, obteniéndose una tasa de multiplicación del doble de plántulas en la orquídea *Encyclia microtos* (Rchb.f.) Hoehne (Condemarín-Montealegre *et al.*, 2007) y *Epidendrum* sp (Valderrama *et al.*, 2009).

Lee *et al.* (2010) reportan callo embriogénico en el medio Murashige y Skoog suplementado con ácido naftalénacético (ANA) y 6-BAP en *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*. a partir de semillas en fotoperiodo de 16 h.

2.8.2.2 Thidiazuron TDZ

El TDZ es una fitohormona con alta actividad como citoquinina, (Wang *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1998; Benega *et al.*, 2000), es un regulador del crecimiento de las plantas que se ha utilizado para la regeneración de plántulas a partir del cultivo *in vitro* (Chen *et al.*, 1998; Benega *et al.*, 2000) y en la micropropagación de un gran número de cultivos (Sarwar y Skirvin, 1997).

Cabe mencionar que todo proceso de diferenciación está regulado por el balance entre auxinas y citoquininas. Para la formación de raíces deben prevalecer las auxinas, mientras que las citoquininas conducirán a la formación del vástago de la planta (Eckardt, 2003).

2.9 Problemas en la inducción de procesos morfogénicos en plantas

En el cultivo de tejidos se presenta principalmente el problema de oxidación en algunas especies de plantas, especialmente leñosas, ocurre por oscurecimientos letales en los explantes y en el medio de cultivo. Se considera uno de los problemas más serios y frecuentes, desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido cultivado *in vitro* (Murkute y Shanti-Patil 2003; Tang y Newton, 2004). Este problema está relacionado al estrés que sufren las células del explante cultivado; y se produce por el desbalance entre la formación de EROs (especies reactivas de oxígeno) y ERNs (especies reactivas de nitrógeno) y los mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos para detoxificar (Novoa *et al.*, 2001; Turrens, 2003).

ERO y ERN a nivel celular son capaces de oxidar irrestrictamente varios componentes celulares y pueden conllevar a una destrucción oxidativa de la célula. Como es el caso de la etapa de establecimiento *in vitro*, luego de ser cortados los explantes empiezan a perder el color verde e inician un oscurecimiento, liberando frecuentemente exudados oscuros al medio de cultivo, que son una mezcla compleja de sustancias fenólicas (metabolitos secundarios que modulan el desarrollo de la planta y su respuesta a estreses bióticos y abióticos); sin embargo, no todos los exudados liberados al medio de cultivo son inhibitorios o tóxicos, pero en la mayoría de los casos el crecimiento del explante es inhibido, perdiendo gradualmente su capacidad de proliferar y, si no se remedia la situación, puede morir (George, 1996; Ogita, 2005).

La oxidación también puede deberse a otros factores ambientales como: explantes senescentes, la intensidad de luz, herbicidas, el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia, composición del medio de cultivo, volumen y calidad del frasco de cultivo (George, 1993; Tabiyeh *et al.*, 2006; Van *et al.*, 2006; Pompeu *et al.*, 2008 y Abdelwahd *et al.*, 2008), lo que limita la respuesta del explante, y generalmente da como resultado la muerte del mismo (George, 1996; Tang y Newton, 2004 y Pompeu *et al.*, 2008).

Algunas sustancias en los medios de cultivo pueden contribuir a disminuir la oxidación (Azofeifa, 2009), en el caso de explantes de orquídeas se ha reportado que el ácido salicílico disminuye la oxidación en explantes de hoja de *L. autumnalis* (Hernández, 2022).

2.10 Ácido salicílico

El ácido salicílico (AS) es un compuesto fenólico y constituyente natural de las plantas (Mady, 2009), el AS debe incluirse en la categoría de fitohormonas, la cual está involucrada en la inducción de respuestas ante estrés biótico y abiótico (López-Delgado *et al.*, 2007). Además de favorecer el crecimiento vegetal, está involucrado en diversos procesos fisiológicos tales como: termogénesis, resistencia a patógenos, inducción a la floración, el crecimiento de raíces y absorción de nutrimentos (Hayat *et al.*, 2007; Larqué-Saavedra y Martín-Mex, 2007). Se ha reportado que preincubaciones con AS de microplantas de *L. autumnalis* disminuye la oxidación y favorece la organogénesis en explantes de hoja (Hernández-Bello *et al.*, 2021a; Hernández-Bello y Mora-Herrera, 2021b). La participación del AS en procesos morfogénicos previamente fue reportada en microplantas de *Solanum cardiophyllum* (López-Delgado *et al.*, 1987) y en microplantas de *S. tuberosum* L. (Mora-Herrera y López-Delgado, 2012).

Se ha sugerido que los efectos promotores del crecimiento del AS pueden estar relacionados con cambios en el estado hormonal (Shakirova *et al.*, 2003; Abreu y Munne-Bosch, 2009) o por mejora de la fotosíntesis (Stevens *et al.*, 2006). Olivares-Aguilar, (2020) menciona que, de acuerdo con algunos antecedentes, el uso de AS durante el desarrollo de raíces en el proceso *in vitro* puede incrementar la sobrevivencia y adaptación a condiciones *ex vitro*.

2.10.1 El ácido salicílico como molécula de señalización en plantas

Las EROs, especialmente el H₂O₂, sirven como moléculas mensajeras por medio de la modificación oxidativa de proteínas de señalización. Entonces, un balance entre la producción de los EROs y su remoción permite una función celular normal, mientras que un desequilibrio causa estrés oxidativo con consecuencias patológicas (Carvajal, 2018).

Benavides-Mendoza (2002) menciona que el daño o estrés oxidativo se presenta cuando la producción de ERO rebasa la capacidad de los sistemas antioxidantes de la célula. Normalmente el nivel de ERO es alto cuando la planta se ve sometida a alguna condición de estrés biótico o abiótico, aunque la presencia de ERO causa daño por oxidación, las plantas también hacen uso de las ERO 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 tal vez ello explique la capacidad del AS de inducir respuestas tan variadas, como las: 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 ERO (Raskin, 1992 en Benavides-Mendoza, 2002).

3. JUSTIFICACIÓN

El objetivo 15 de desarrollo sostenible “vida terrestre y ecosistemas” establece que: “se deben tomar medidas urgentes para reducir la pérdida de hábitats naturales y biodiversidad que forman parte de nuestro patrimonio común”. Y se hace necesario proteger, restablecer y promover el uso sostenible de los ecosistemas terrestres, gestionar sosteniblemente los bosques, luchar contra la desertificación, detener e invertir la degradación de las tierras y detener la pérdida de biodiversidad. La flora además es fundamental para combatir el cambio climático (ONU, 2015).

Las orquídeas, están afrontando problemas de disminución de sus poblaciones, derivado de la destrucción del hábitat y del saqueo (Ávila-Díaz y Salgado-Garciglia, 2006), por lo que son especialmente vulnerables a la extinción (Turner *et al.*, 1994; Salazar-Rojas *et al.*, 2007). De igual manera la extracción crónica de orquídeas afecta la dinámica demográfica de sus poblaciones, ya que al extraer fracciones vegetativas de la planta se altera su crecimiento (Halbinger y Soto, 1997).

Se ha demostrado que *L. autumnalis* es una especie autocompatible no autógena, donde la autocruza tiene altos costos de endogamia al reducir la producción de semillas viables, por lo que en poblaciones endógamas la adecuación disminuirá 63 % y que la producción natural de frutos se encuentra entre las más bajas reportadas entre las especies de orquídeas (Emeterio-Lara, 2019). Además, las orquídeas que se han visto más afectadas han sido las especies con alto potencial ornamental, entre los géneros que incluyen especies de alta importancia hortícola se encuentran: *Laelia*, por sus flores grandes y espectaculares; *Oncidium*, por la belleza de sus inflorescencias y la potencialidad de crear híbridos (Emeterio-Lara *et al.*, 2016). Por lo que se hace necesario, establecer herramientas que coadyuven a reestablecer las poblaciones y la biotecnología puede ser implementada a través de la morfogénesis.

4. HIPÓTESIS

Los explantes de hoja y raíz de microplantas de *Laelia autumnalis* precultivadas en ácido salicílico, favorecerá las respuestas morfogénicas mediadas por auxinas/citocininas y horas luz.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Inducir procesos morfogénicos mediados por auxinas/citocininas y horas luz en explantes de hoja y raíz de microplantas de *Laelia autumnalis* precultivadas en ácido salicílico.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de auxinas y citoquininas en las respuestas morfogénicas de raíz con ápice, raíz sin ápice y hoja entera de microplantas de *Laelia autumnalis* precultivadas en AS, es presencia de luz.
- Evaluar el efecto de auxinas y citoquininas en las respuestas morfogénicas de raíz con ápice, raíz sin ápice y hoja entera de microplantas de *Laelia autumnalis* precultivadas en AS, en ausencia de luz.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Sitio experimental

La investigación se realizó en el Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal del Centro Universitario UAEM Tenancingo; el cual está ubicado en la Carretera Tenancingo - Villa Guerrero Km. 1.5, C.P. 52400, Tenancingo; Estado de México, México.

6.2 Material vegetal

El material vegetal que se utilizó en este trabajo fue, microplantas de *Laelia autumnalis* provenientes del Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal del Centro Universitario UAEM Tenancingo (Figura 11).



Figura 11. Microplantas de *Laelia autumnalis* regeneradas *in vitro* en el Centro Universitario UAEM Tenancingo.

6.3 Condiciones del cultivo

6.3.1 Incubación de microplantas

-Los cultivos *in vitro* de *L. autumnalis* se mantuvieron en un cuarto de incubación con un fotoperiodo de 16 horas, con una radiación de *ca* $35 \mu\text{mol m}^2 \text{seg}^{-1}$, 400-700 nm y una temperatura de $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 12.A). Mientras que los experimento en ausencia de luz se mantuvieron en un cuarto de incubación sin fotoperiodo a una temperatura de $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 12.B).

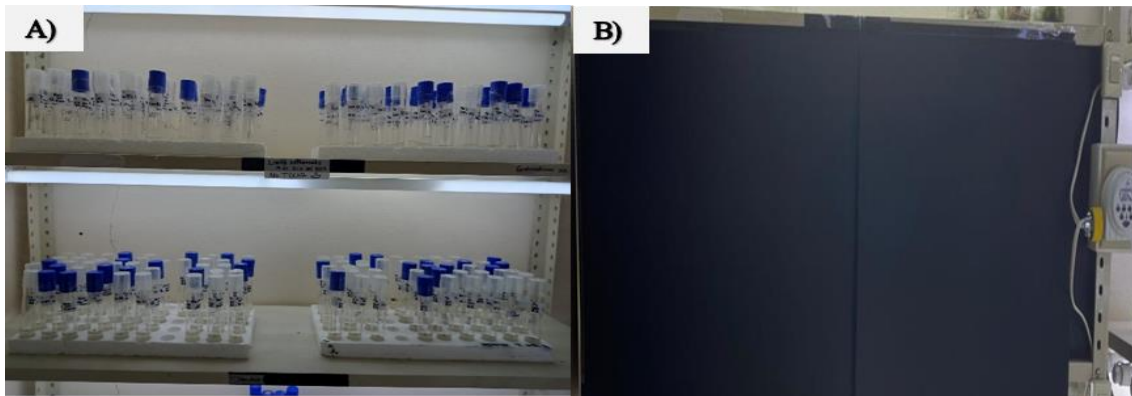


Figura 12. Condiciones de cultivo, A) presencia de luz y B) ausencia de luz (en cámara de oscuridad).

6.4 Medio de propagación masiva de *L. autumnalis*

El medio de cultivo se preparó mezclando las cantidades requeridas de sales inorgánicas y vitaminas. Las vitaminas y las sales se tomaron de las soluciones concentradas conocidas según Mora-Herrera (2007) con sales 4.4 g L^{-1} , sulfato de magnesio (MgSO_4) 0.37 g L^{-1} , inositol 0.1 g L^{-1} , hierro (Fe) 0.065 g L^{-1} , tiamina 0.0004 g L^{-1} , pantotenato de calcio 0.002 g L^{-1} , glicina 0.00005 g L^{-1} , sacarosa 30 g L^{-1} , (Cuadro 1). Posteriormente se aforó y se ajustó el pH entre 5.6 y 5.7 con hidróxido de potasio (KOH) 1N; después, como agente gelificante, se agregó 7.5 g L^{-1} de agar bacteriológico el cual se disolvió con calor. Posteriormente se adicionó 10 mg L^{-1} de medio de cultivo en tubos de ensayo de 20 x 150 mm con tapa translúcida. Los medios de cultivo y materiales de siembra (cajas de Petri, pinzas y bisturí); se esterilizaron en una autoclave de presión a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos, el procedimiento se describe en la Figura 13.A.

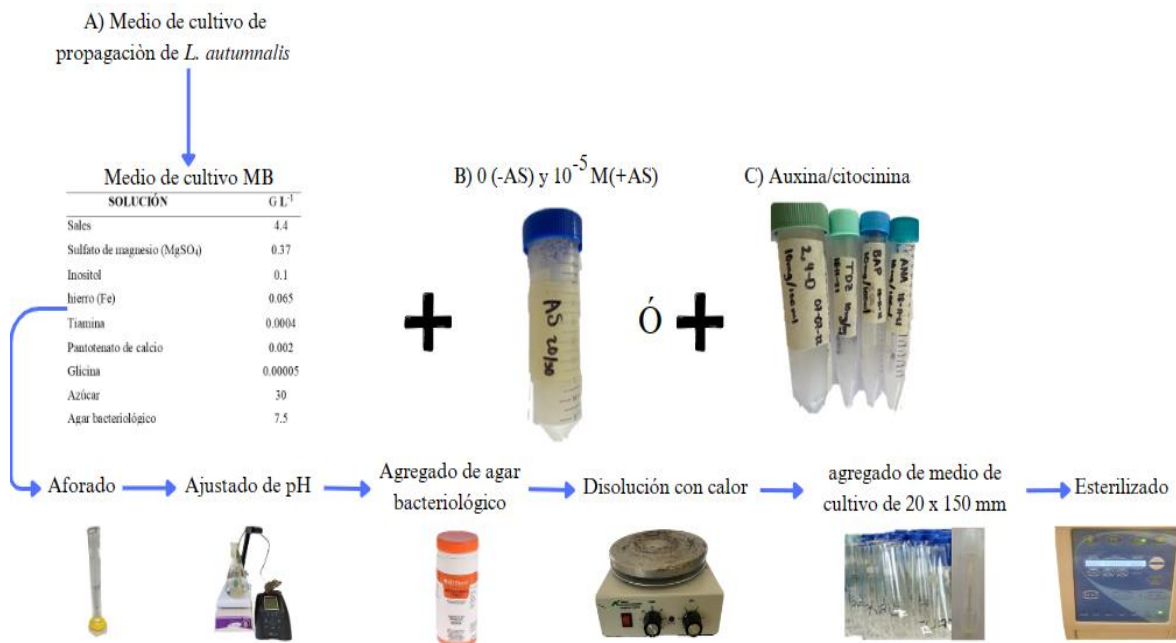


Figura 13. A) Descripción de la preparación de los medios de cultivo para la propagación masiva de microplantas de *Laelia autumnalis* en B) en ácido salicílico y C) en auxina citocininas.

Cuadro 1. Soluciones para el medio de cultivo Murashige y Skoog 1962 MS descrito por Mora-Herrera (2007).

SOLUCIÓN	g L ⁻¹	Marca
Sales	4.4	
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	0.37	Fermont®
Inositol	0.1	Sigma®
hierro (Fe)	0.065	Fermont®
Tiamina	0.0004	Sigma®
Pantotenato de calcio	0.002	Sigma®
Glicina	0.00005	Sigma®
Azúcar	30	Comercial
Agar bacteriológico	7.5	BD Bioxon®

6.5 Propagación masiva de material vegetal

Para mantener una fuente permanente de material biológico se realizó la propagación de microplantas de *L. autumnalis* bajo condiciones *in vitro* empleando medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con 50 % de sales (Figura 14).



Figura 14. Establecimiento de la propagación masiva en microplantas de *Laelia autumnalis*.

6.6 Descripción del experimento

Para el desarrollo del experimento, primero se realizó la micropropagación masiva de *L. autumnalis* (Figura 14), posteriormente se subcultivaron en medios MS más AS a una concentración de 0 (testigo), o 10^{-5} M y durante 2 meses. Una vez transcurrido ese tiempo se realizaron disecciones para obtener los explantes de aproximadamente de 6-8 mm: A) hojas completas, B) raíces con ápice y C) raíces sin ápice. Estos explantes se subcultivaron en los medios de los tratamientos con auxinas y/o citocininas en las concentraciones de ANA, BAP, TDZ Y 2,4-D referidas en el cuadro 2 y se mantuvieron en incubación con un fotoperiodo de 16 y 8 h. durante 4 meses. El experimento se realizó a través del mismo procedimiento solo que en oscuridad total. Posteriormente, cada 15 días se determinó el número de explantes oxidados, con procesos morfogénicos, o cualquier otra respuesta (Figura 15).

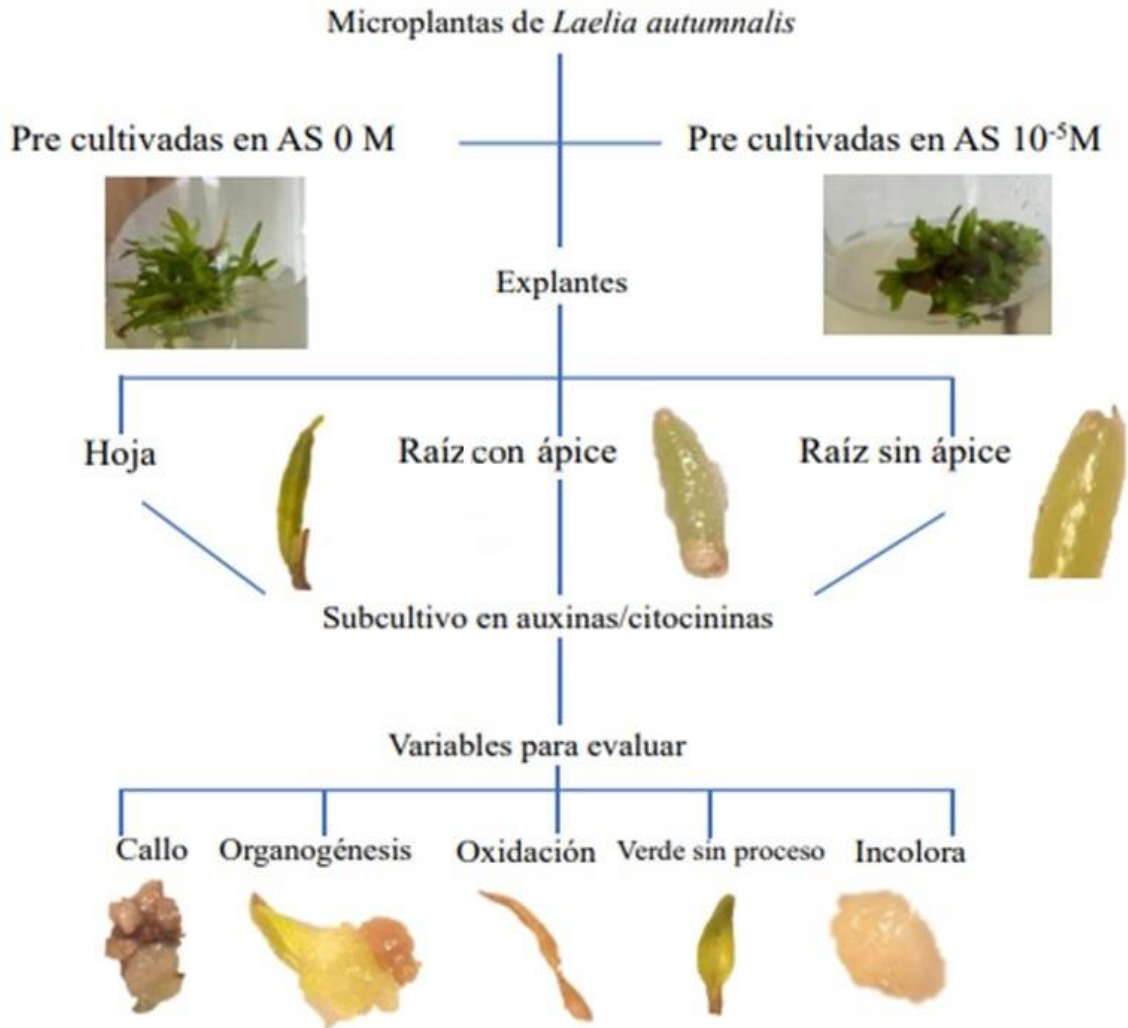


Figura 15. Descripción del experimento de los procesos morfogénicos en microplantas de *Laelia autumnalis* pre-cultivadas en ácido salicílico en presencia de luz y ausencia de luz.

6.7 Medio de preincubación con AS

Para la pre-cultivación en AS de microplantas de *L. autumnalis*; se sembraron en medio de cultivo MS sólido (Figura 13.A; preparado como se indica en el punto 6.4) y adicionado con AS a una concentración de 0 y 10⁻⁵ M, tomado de una solución de 20 mg de AS en 50 mL de agua destilada, previamente el AS se disolvió con hidróxido de potasio (KOH) 1 N y posteriormente se aforó con agua destilada (Figura 13.A +B); este se mantuvo en las mismas condiciones indicadas en el apartado 6.3 (Figura 12.A).

6.8 Cultivo de microplantas con AS 0 y 10^{-5} M

Se realizó el establecimiento del cultivo de *L. autumnalis* en medio de cultivo MS adicionado con AS en una concentración de 0 y 10^{-5} M. para la siembra se tomaron microplantas de *L. autumnalis* y se colocaron en una caja de Petri previamente esterilizada en autoclave y flameadas con el mechero. Enseguida, con ayuda de pinzas y bisturí se retiraron las partes con oxidación o incoloras, una vez limpiadas las microplantas se abrió un tubo de 20 x 150 mm, el cual se flameo para evitar contaminación alguna, se colocaron las microplantas en contacto con el medio MS adicionado con AS 0 y 10^{-5} M como se indica en el punto 6.6. Los tubos se sellaron con plástico auto adherente, y se etiquetaron con la fecha de establecimiento del cultivo (Figura 16) y se incubaron en presencia de luz (como se indica en el apartado 6.3 Figura 12.A). El establecimiento del cultivo tuvo una duración de un periodo de 2 meses, con una revisión de cada 15 días.

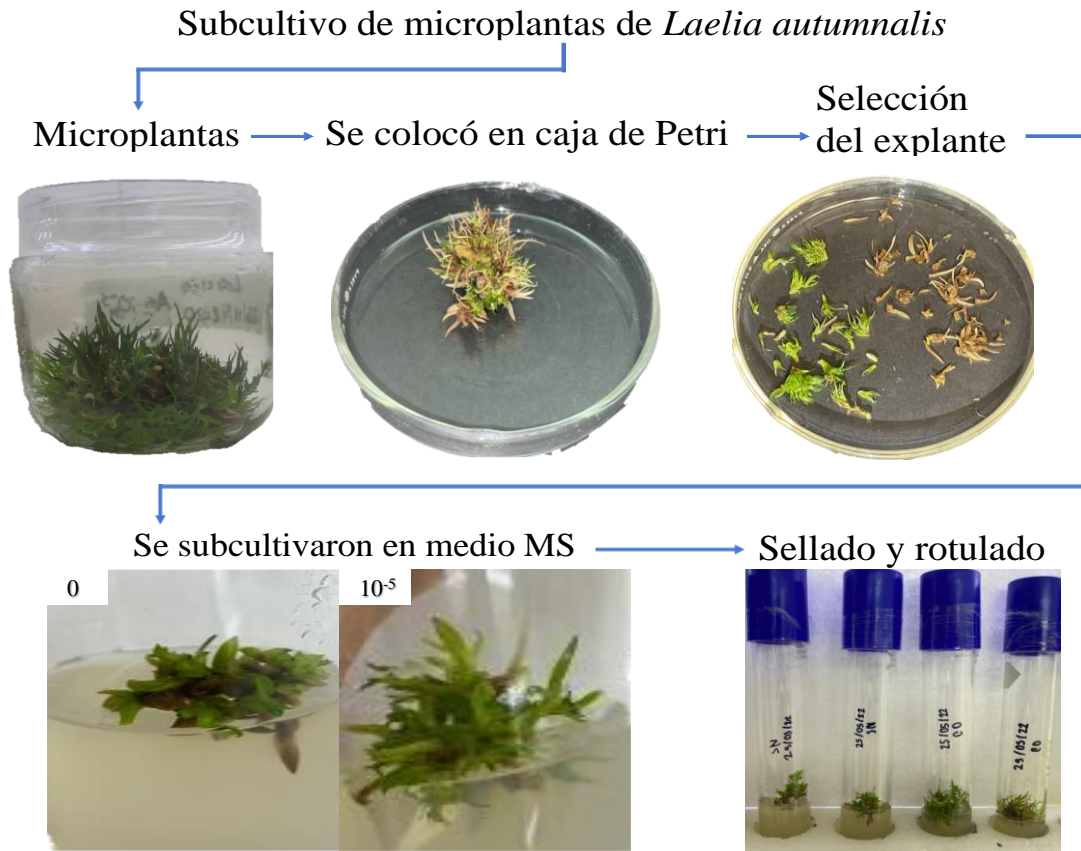


Figura 16. Descripción del cultivo de microplantas de *Laelia autumnalis* con 0 y 10⁻⁵ M de AS.

6.9 Medio de inducción de procesos morfogénicos empleando auxinas y citocininas

Para inducir procesos morfogénicos se sembraron a medio MS sólido (preparado como en el punto 6.4), más adición de las fitohormonas 6-bencil-aminopurina (BAP), thidiazurón (TDZ), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y/o ácido naftalenacetico (ANA; cuadro 2; Figura 13.A +C) y se mantuvieron en las mismas condiciones indicadas en el punto 6.3 (Figura 12.A y B). Se utilizaron explantes de hoja completa, raíz con ápice o raíz sin ápice de *L. autumnalis* precultivadas con 0 y 10⁻⁵ M de AS.

Cuadro 2. Combinación y concentraciones de las fitohormonas (mg L^{-1}) por tratamiento, para inducir procesos morfológicos en microplantas de *L. autumnalis* precultivadas con 0 y 10^{-5} M de AS.

Tratamiento	BAP	ANA	TDZ	2,4-D
0 (Testigo)	0	0	0	0
1	0.35	0.35	0	0
2	0.525	0.35	0	0
3	0.7	0	0	0.7
4	0	0.35	1.05	0
5	1.05	0	0	0

6.10 Propagación del subcultivo para inducción de procesos morfológicos empleando auxinas y citocininas

Se realizó el establecimiento del subcultivo de microplantas de *L. autumnalis* precultivadas con 0 y 10^{-5} M de AS (como se indica en el punto 6.8). Para la siembra se tomaron microplantas de *L. autumnalis* y se colocaron en una caja de Petri previamente esterilizada en autoclave y flameada con el mechero. Enseguida, con ayuda de pinzas y bisturí se retiraron las partes con oxidación o incoloras, una vez limpiadas las microplantas se realizaron disecciones de \pm 6-8 mm de los explantes de: A) hojas completas (con el envés de la hoja en contacto con la superficie), B) raíz con ápice (con el lado sin ápice en contacto con la superficie y C) raíz sin ápice (con algún lado sin ápice en contacto con la superficie). Posteriormente se abrió un tubo de 20 x 150 mm, el cual se flameo para evitar contaminación, y se colocaron los explantes de las microplantas en contacto con el medio MS adicionado con auxinas y/o citocininas en las concentraciones de ANA, BAP, TDZ y 2,4-D referidas en el cuadro 2. Los tubos se sellaron con plástico auto adherente, se etiquetaron con la fecha de establecimiento del cultivo (Figura 17) y se incubaron en presencia de luz y/o ausencia de luz (como se indica en el apartado 6.3 Figura 12). El establecimiento del subcultivo tuvo una duración de 4 meses, con una revisión cada 15 días.

Subcultivo de microplantas de *Laelia autumnalis* 0 y 10^{-5} M

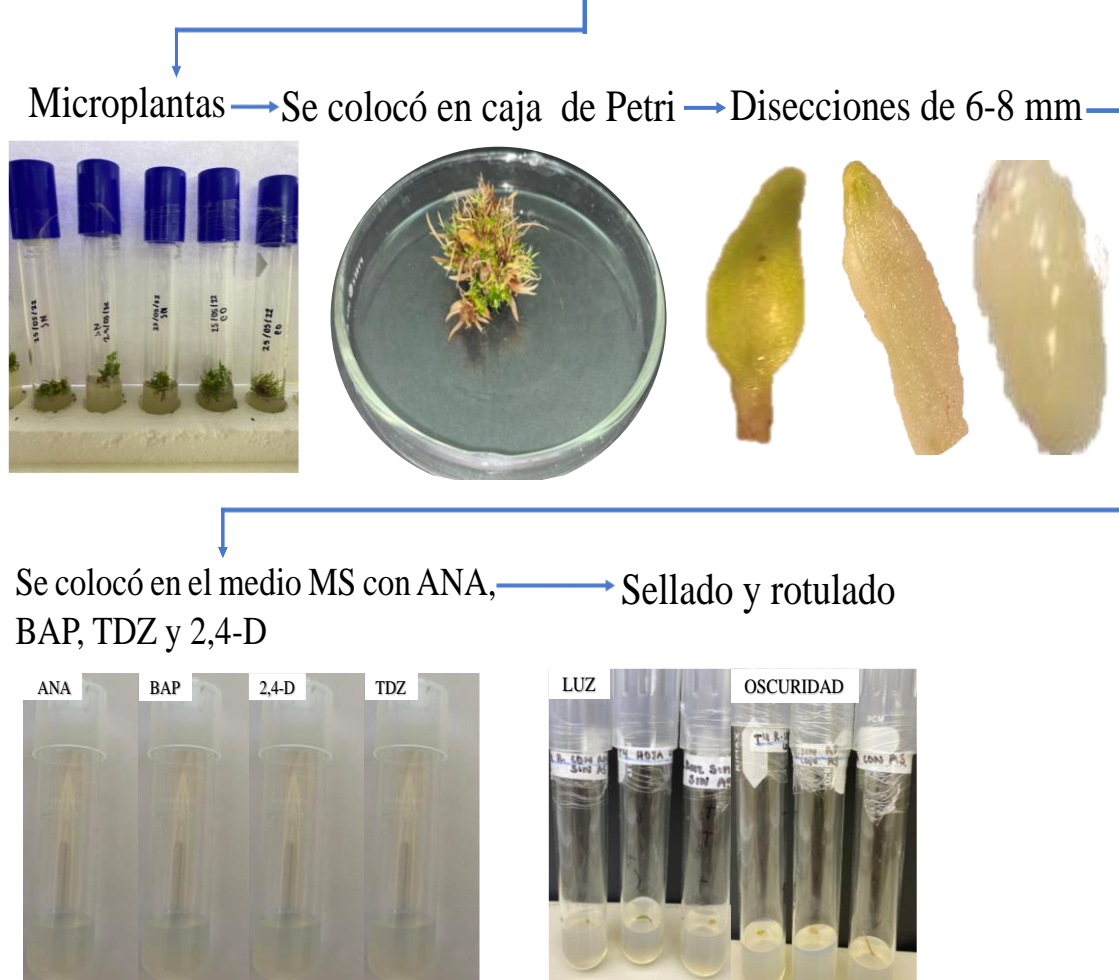


Figura 17. Descripción del subcultivo de auxinas y citocininas de microplantas de *Laelia autumnalis* con 0 y 10^{-5} M de AS.

6.11 Variables para evaluar

Se evaluará el porcentaje de distintos tipos de respuesta *in vitro* (callo, organogénesis, oxidación, verde sin proceso morfológico e incolora), a partir de los 4 meses después de la siembra. El porcentaje de estructuras (n) de callos, organogénesis oxidación, verde sin proceso morfológicos e incolora, se determinó mediante la relación: porcentaje (%) de $n = \frac{[(\text{número de explantes con estructura formada}) / (\text{número total de explantes sembrados})] \times 100}{100}$.

6.11.1 Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño de bloques completos al azar, con 5 repeticiones por tratamiento. Para el análisis estadístico de los datos (porcentaje de explantes con proceso morfogénico, oxidación, verde sin proceso o incolora) se utilizó los datos se expresan con estadística descriptiva (Wayne, 2013).

7 RESULTADOS

7.2 Efecto de auxinas y citocininas en las respuestas morfogénicas en ausencia de luz de explantes de microplantas de *Laelia autumnalis* precultivadas en AS

7.2.1 Formación de callo

Los explantes de raíz presentaron mayor formación de callos con respecto a los de hoja, siendo mayor en raíces sin ápice. Los explantes provenientes de microplantas precultivadas en ácido salicílico (+AS) presentaron mayor formación de callos con respecto a las que no estuvieron precultivadas de ácido salicílico (-AS; Figura 18).

Los explantes de hoja de los tratamientos en +AS, tuvieron mayor formación de callos con respecto a los explantes provenientes de microplantas en -AS, el tratamiento con mayor formación callos fue el 5 (+AS BAP 1.05 mg L⁻¹) con un 80 %, cabe mencionar que en todos los tratamientos con explantes de hoja en -AS tuvieron un 0 % de formación de callos a excepción del tratamiento testigo que tuvo un 20 % (Figura 18.A).

Los explantes de raíz con ápice en algunos de los tratamientos en +AS presentaron mayor formación de callos comparado con los explantes en -AS, aunque, en el tratamiento 1 (-AS y +AS BAP 0.35/ANA 0.35 mg L⁻¹) se obtuvo un 100 % de formación de callos (Figura 18.B). Los explantes de raíz sin ápice en la mayoría de los tratamientos en +AS presentaron hasta 100 % en los tratamientos 0 (+AS testigo), 2 (+AS BAP 0.525/ANA 0.35 mg L⁻¹) y 5 (+AS BAP 1.05 mg L⁻¹) de formación de callos comparado con los tratamientos -AS (Figura 18.C).

En la Figura 19 se observan los callos formados por efecto de los tratamientos de precultivo en AS y la combinación hormonal auxinas/citocininas, donde se observan primordios foliares iniciales, callos de diferentes tamaños. Los callos más grandes se observaron en los explantes de raíz con ápice en los tratamientos T0 y T2 con AS (Figura 19.A) y en raíz sin ápice en el tratamiento T0 con AS (Figura 19.B).

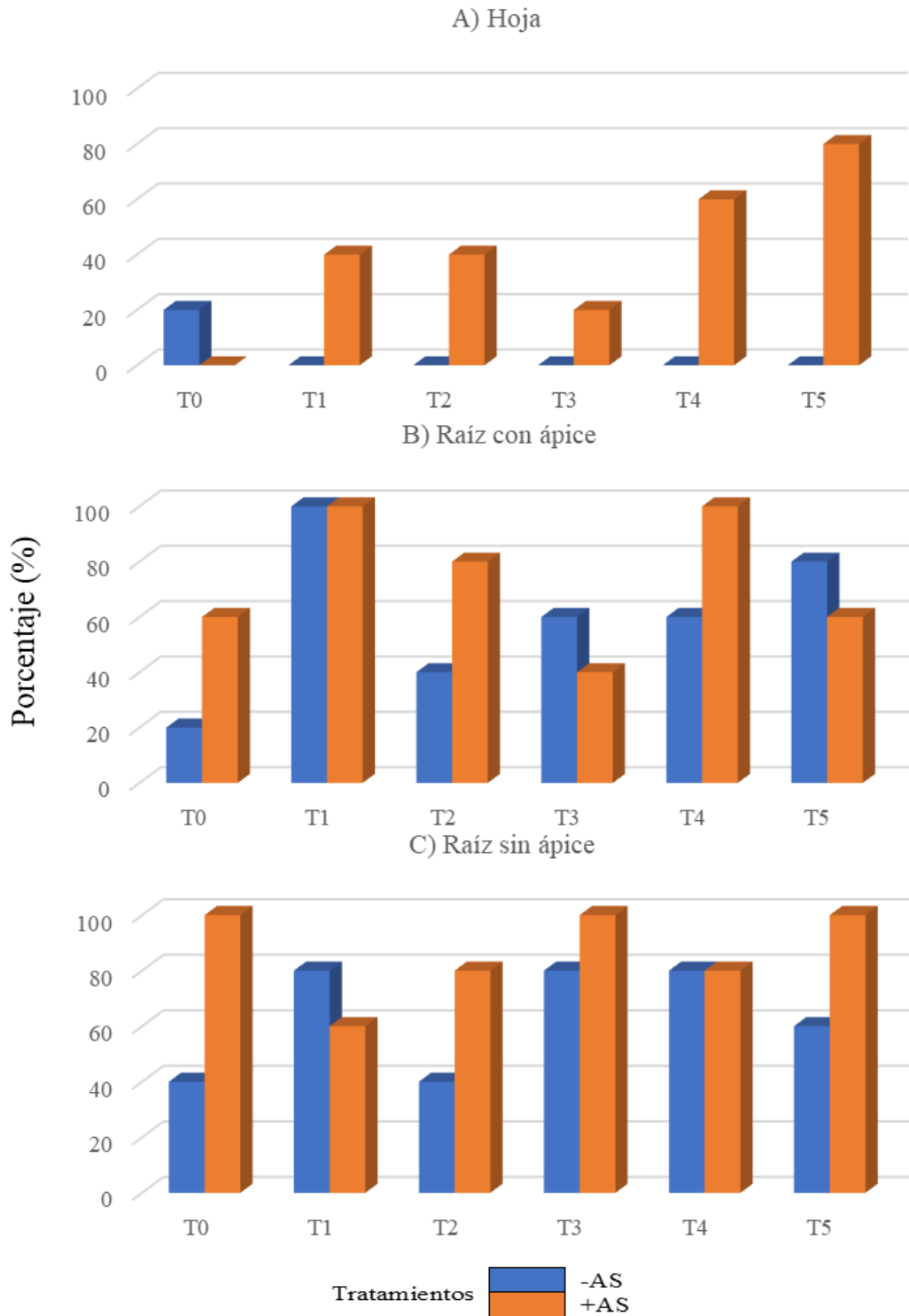


Figura 18. Porcentaje de formación de callos en condiciones de oscuridad de explantes de; A) hoja, B) raíz con ápice y C) raíz sin ápice, provenientes de microplantas de *Laelia autumnalis* precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas.

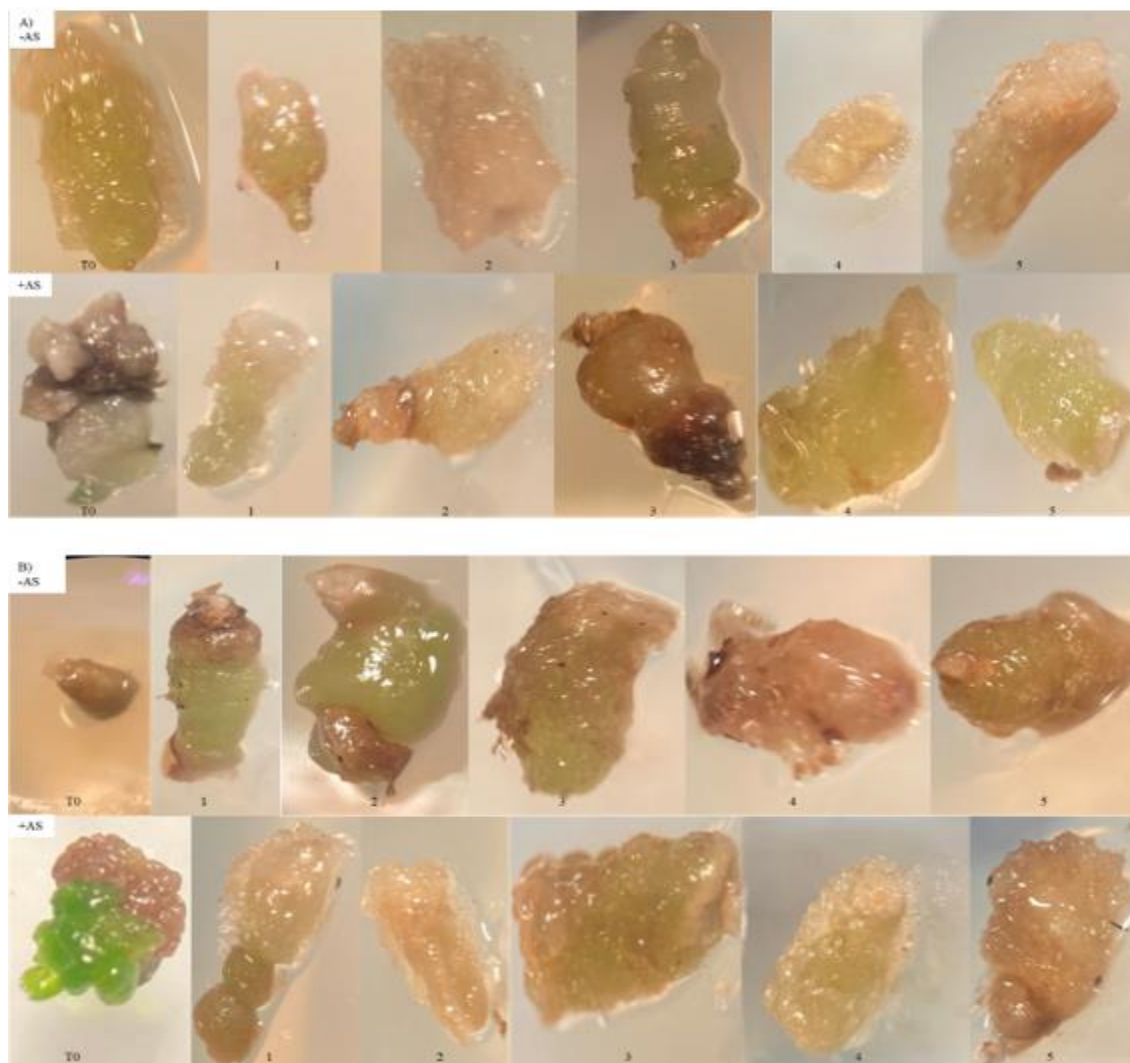


Figura 19. Callos en condiciones de oscuridad de explantes de A) raíz con ápice y B) sin ápice, provenientes de microplantas de *Laelia autumnalis* precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas.

7.2.2 Formación de órganos

Los explantes de hoja presentaron mayor formación de órganos con respecto a los de raíz (Figura 20). La formación de órganos en hoja fue en los tratamientos: 1 (-AS BAP 0.35/ANA 0.35 mg L⁻¹), 2 (-AS BAP 0.525/ANA 0.35 mg L⁻¹), 3 (-AS ANA 0.7/2,4-D 0.7 mg L⁻¹), 4 (-AS ANA 0.35/TDZ 1.05 mg L⁻¹) y 5 (-AS BAP 1.05 mg L⁻¹; Figura 20.A). En los explantes de raíz con ápice en el tratamiento 0 (-AS testigo) se obtuvo un 40 % de formación de órganos y 20 % de en los tratamientos 0 (+AS testigo), 2 (+AS BAP 0.525/ANA 0.35 mg L⁻¹) y 5

(+AS BAP 1.05 mg L⁻¹; Figura 20.B). En los explantes de raíz sin ápice presentaron 20 % de formación de órganos en los tratamientos 0 (testigo) y 2 (-AS BAP 0.525/ANA 0.35 mg L⁻¹), mientras que en el tratamiento 1 (+AS BAP 0.35/ANA 0.35 mg L⁻¹) se obtuvo 40 % (Figura 20.C).

En la Figura 21, se observan los órganos formados y la oxidación en el explante de hoja de microplantas precultivadas en AS y subcultivadas en auxinas/citocininas, una respuesta observada, fue que del explante oxidado posteriormente se desarrolló un órgano en la mayoría de los casos.

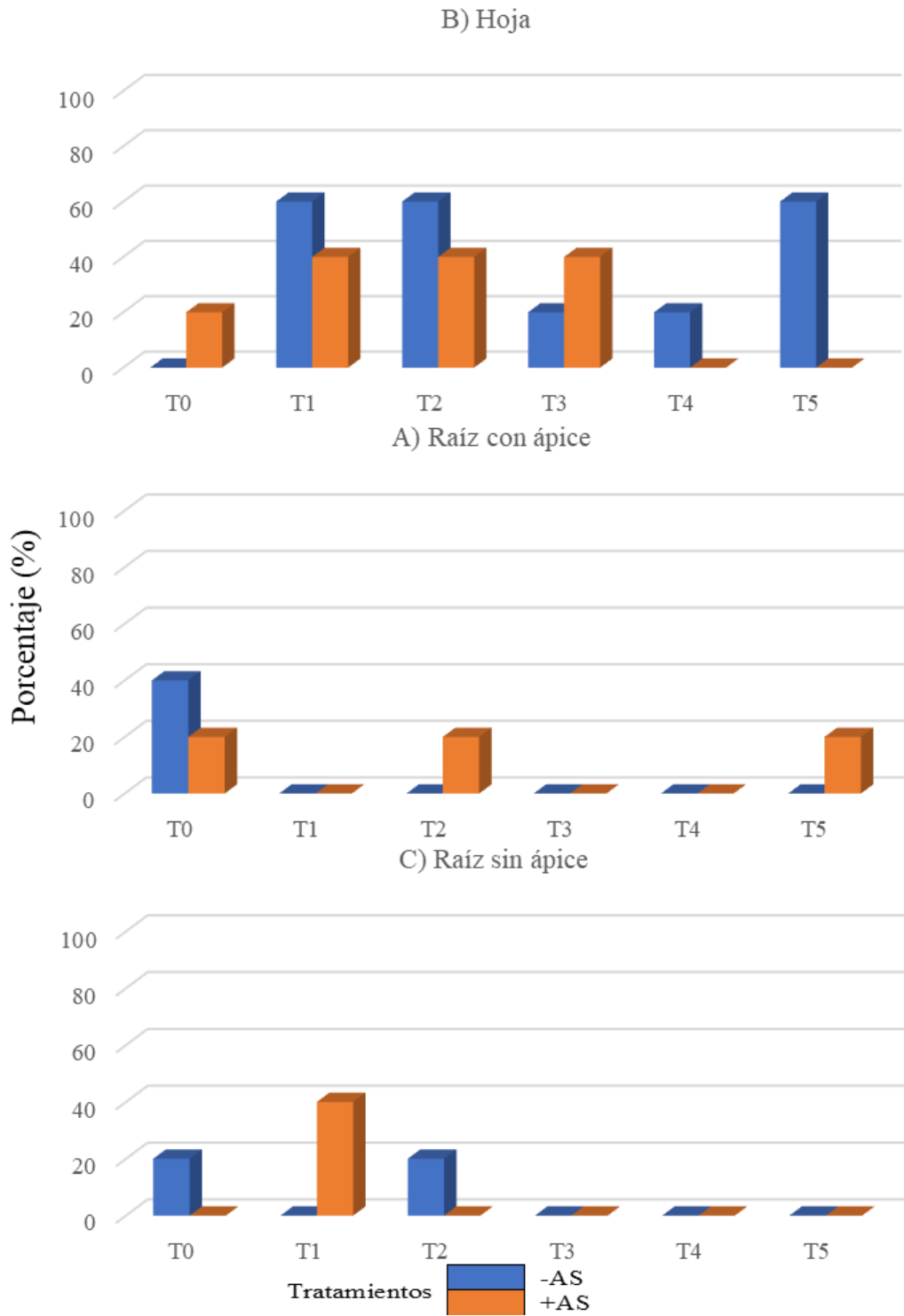


Figura 20. Porcentaje de formación de organogénesis en condiciones de oscuridad de explantes de; A) hoja, B) raíz con ápice y C) raíz sin ápice, provenientes de microplantas de *Laelia autumnalis* precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas.



Figura 21. Organogénesis en condiciones de oscuridad de explantes de hoja, provenientes de microplantas de *Laelia autumnalis* precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas.

7.3 Explantes sin procesos morfogénicos de microplantas de *Laelia autumnalis* precultivadas en AS

7.2.1 Explantes oxidados

Los explantes de raíz presentaron menor oxidación con respecto a los de hoja. Los explantes provenientes de microplantas con los tratamientos en +AS presentaron menor oxidación con respecto a las -AS incluso en hoja (Figura 22).

Los explantes de hoja presentaron oxidación en la mayoría de los tratamientos, sin embargo, en los tratamientos 2 (+AS BAP $0.525/ANA 0.35 \text{ mg L}^{-1}$) y 5 (-AS y +AS BAP 1.05 mg L^{-1}) no se obtuvo oxidación (Figura 22.A). Por otro lado, en los explantes de raíz con ápice en algunos de los tratamientos no presentaron oxidación, solo se observó 20 % en los tratamientos, 2 (-AS BAP $0.525/ANA 0.35 \text{ mg L}^{-1}$), 3 (-AS y +AS ANA $0.7/2,4-D 0.7 \text{ mg L}^{-1}$) y 5 (+AS BAP 1.05 mg L^{-1} ; Figura 22.B). En el caso de los explantes de raíz sin ápice en todos los tratamientos en +AS no se presentó oxidación, mientras que en los tratamientos 0

(testigo), 1 (-AS BAP 0.35/ANA 0.35 mg L⁻¹) y 5 (-AS BAP 1.05 mg L⁻¹) si se observó (Figura 22.C).

La Figura 23 muestra los explantes de hoja completa, raíz con ápice y sin ápice oxidados, sin proceso morfológico que posteriormente se necrosaron.

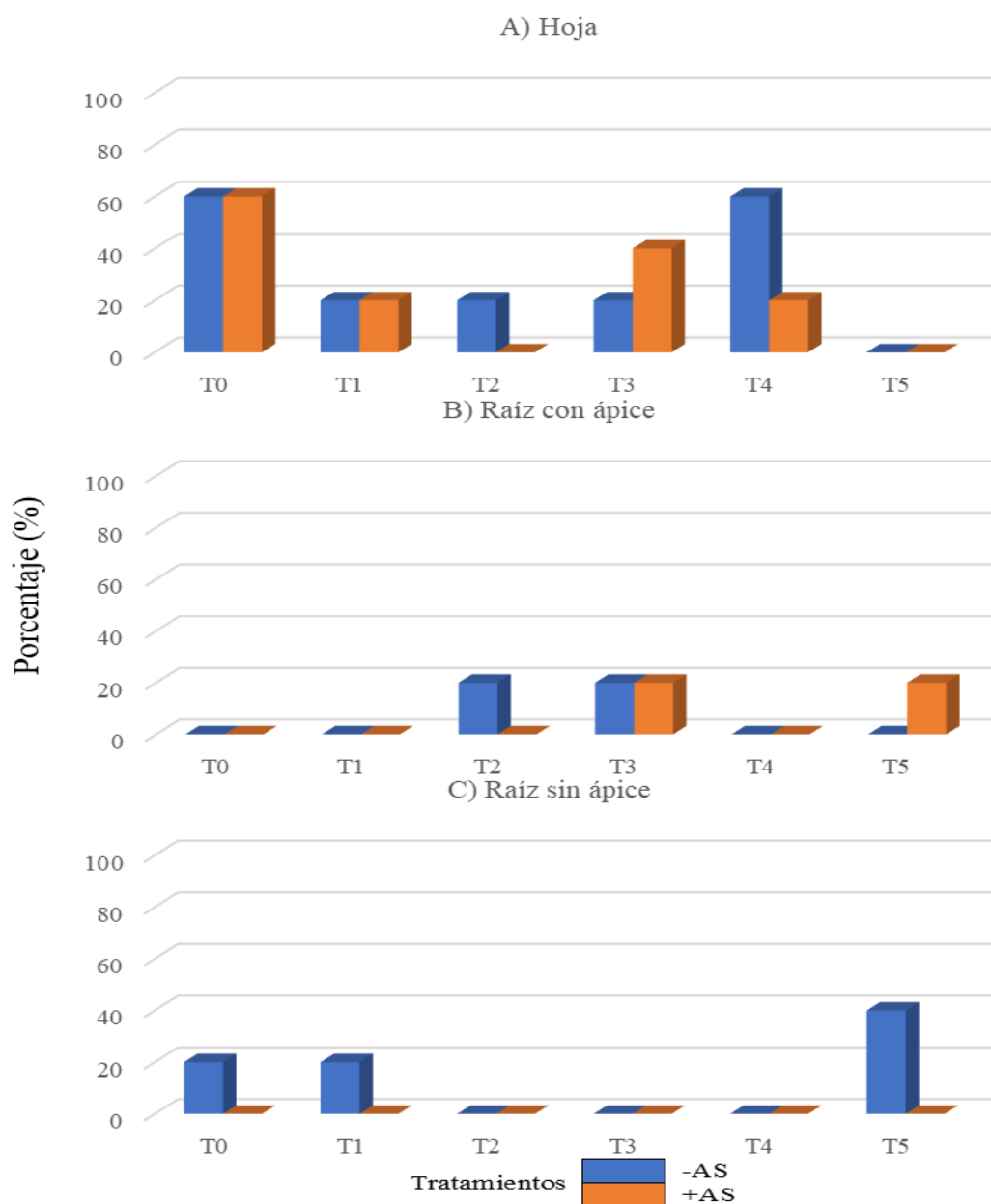


Figura 22. Porcentaje de oxidación en condiciones de oscuridad de explantes de; A) hoja, B) raíz con ápice y C) raíz sin ápice, provenientes de microplantas de *Laelia autumnalis* precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10⁻⁵ (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas.



Figura 23. Oxidación en condiciones de oscuridad de explantes de A) hoja, B) raíz con ápice y C) raíz sin ápice, provenientes de microplantas de *Laelia autumnalis* precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas.

7.2.2 Explantes verdes e incoloros

Se destaca que los explantes que no presentaron proceso morfogénico ni se oxidaron permanecieron verdes o incoloros, y en los que provenían de plantas precultivadas en AS fue menor la presencia de este proceso (Cuadro 3). Un 60 % de explantes de hoja permanecieron verdes en el tratamiento 3 (-AS ANA $0.7/2,4-D$ 0.7 mg L^{-1}) y 20 % de etiolados (incoloros) en los tratamientos 0 (-AS testigo) y 2 (+AS BAP $0.525/ANA$ 0.35 mg L^{-1} ; Cuadro 3).

Los explantes de raíz con ápice que permanecieron verdes fueron los que se encontraron en los tratamientos 0 (-AS testigo), 2 (-AS BAP $0.525/ANA$ 0.35 mg L^{-1}) y 3 (+AS ANA $0.7/2,4-D$ 0.7 mg L^{-1}) con un 40 % y los explantes etiolados (incoloros) en los tratamientos 0 (+AS testigo) y 4 (-AS ANA $0.35/TDZ$ 1.05 mg L^{-1}) con un 20 % (Cuadro 3). Por otro lado, los explantes de raíz sin ápice permanecieron verdes solo en el tratamiento 4 (-AS y +AS ANA $0.35/TDZ$ 1.05 mg L^{-1}) con un 20 % y el 40 % etiolados (incoloros) en el tratamiento 2 (-AS BAP $0.525/ANA$ 0.35 mg L^{-1} ; Cuadro 3).

La Figura 24 muestra los explantes de hoja completa, raíz con ápice y sin ápice verdes e incoloros, ninguno tuvo procesos morfogénicos, sin embargo, cabe la posibilidad que los explantes verdes con mayor tiempo pudieran desarrollar algún proceso morfogénico.

Cuadro 3. Porcentaje de explantes verdes sin proceso e incoloros en condiciones de oscuridad de explantes de; A) hoja, B) raíz con ápice y C) raíz sin ápice, provenientes de microplantas de *Laelia autumnalis* precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas.

Tratamiento	Hoja		Raíz con ápice		Raíz sin ápice	
	Verdes sin proceso	incoloras	Verdes sin proceso*	incoloras	Verde sin proceso	incoloras
0-AS	0	20	40	0	0	20
0+AS	20	0	0	20	0	0
1-AS	20	0	0	0	0	0
1+AS	0	0	0	0	0	0
2-AS	20	0	40	0	0	40
2+AS	0	20	0	0	0	20
3-AS	60	0	20	0	0	20
3+AS	0	0	40	0	0	0
4-AS	20	0	20	20	20	0
4+AS	20	0	0	0	20	0
5-AS	40	0	20	0	0	0
5+AS	20	0	0	0	0	0

*porcentajes.

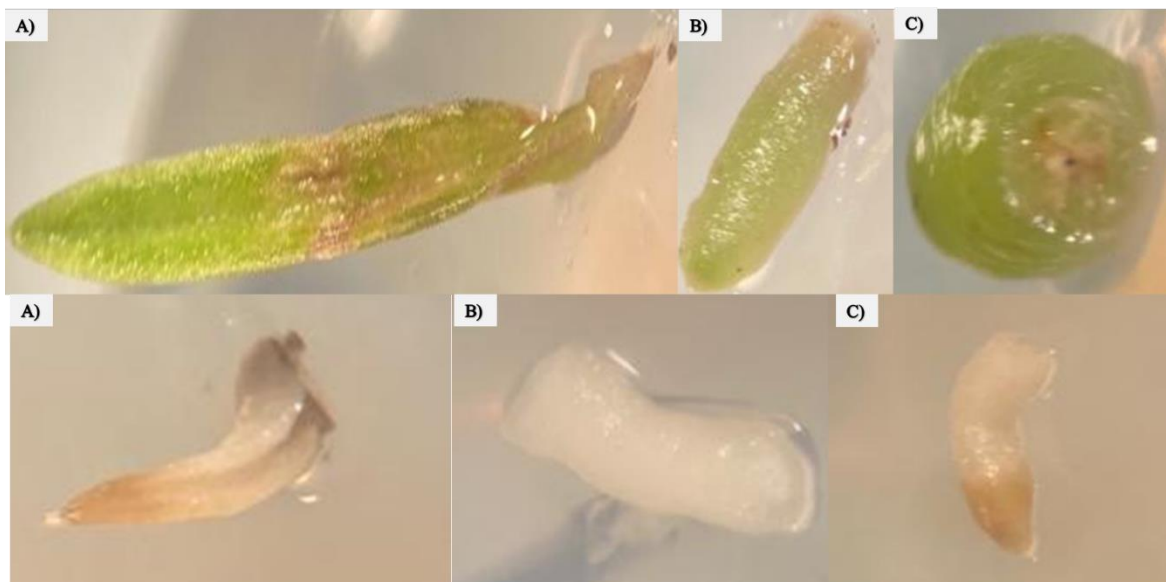


Figura 24. Verde en condiciones de oscuridad de explantes de A) hoja, B) raíz con ápice y C) raíz sin ápice, provenientes de microplantas de *Laelia autumnalis* precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas.

7.3 Efecto de auxinas y citocininas en las respuestas morfogénicas en presencia de luz de explantes de microplantas de *Laelia autumnalis* precultivadas en AS

7.3.1 Formación de callo

Los explantes de raíz presentaron mayor formación de callos con respecto a los de hoja, siendo mayor en raíces con ápice. Los explantes provenientes de microplantas precultivadas en ácido salicílico (+AS) presentaron mayor formación de callos con respecto a las que no estuvieron precultivadas en ácido salicílico (-AS), incluso en explantes de hoja (Figura 25).

En los explantes de hoja en +AS tuvieron mayor formación de callos respecto a los explantes provenientes de microplantas en -AS, el tratamiento con mayor formación de callos fue el 2 (+AS BAP 0.525/ANA 0.35 mg L⁻¹) con un 40 %. Cabe mencionar que en la mayoría de los tratamientos con explantes de hoja en -AS tuvieron un 0 % de formación de callos a excepción del tratamiento 1 (BAP 0.35/ANA 0.35 mg L⁻¹) y 2 (BAP 0.525/ANA 0.35 mg L⁻¹) que tuvieron un 20 % (Figura 25.A).

En el caso de los explantes de raíz con ápice en los tratamientos 3 y 4 (-AS y +AS ANA 0.35/TDZ 1.05 mg L⁻¹) tuvieron un 80 % de formación de callos con respecto a los demás tratamientos (Figura 25.B). Similarmente, los explantes de raíz sin ápice en el tratamiento 0 (+AS testigo) tuvieron 100 % de formación de callos con respecto a los demás tratamientos (Figura 25.C).

En la Figura 26 se observan los callos formados en los explantes de raíz con y sin ápice de microplantas precultivadas en AS y subcultivadas en auxinas/citocininas, donde se observan primordios foliares iniciales, callos de diferentes tamaños. Los callos más grandes se observaron en los explantes de raíz con ápice en los tratamientos T0 y T2 con AS (Figura 26.A) y en raíz sin ápice en el tratamiento T3 con AS (Figura 26.B).

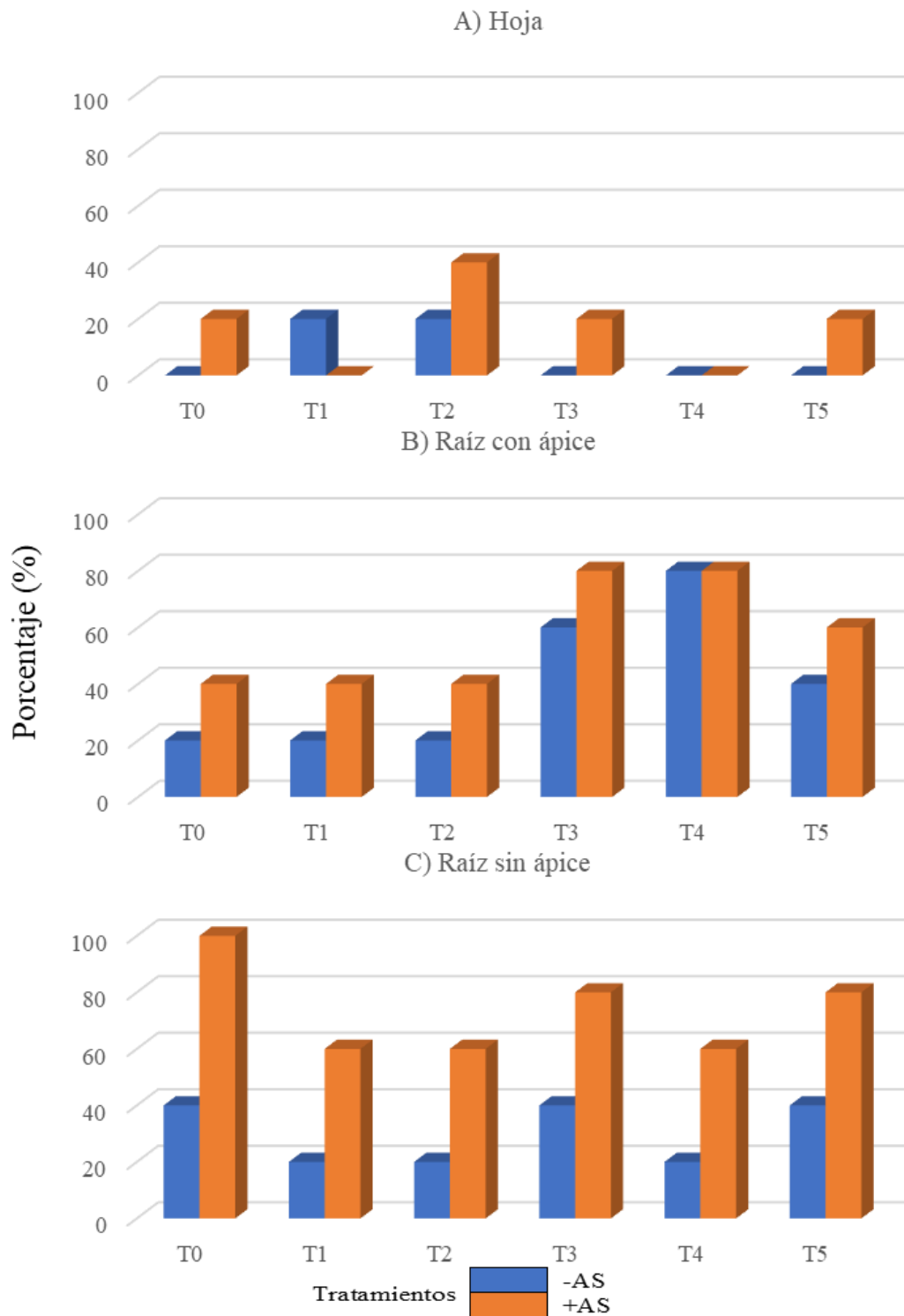


Figura 25. Porcentaje de formación de callos en condiciones de luz de explantes de; A) hoja, B) raíz con ápice y C) raíz sin ápice, provenientes de microplantas de *Laelia autumnalis* precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas.

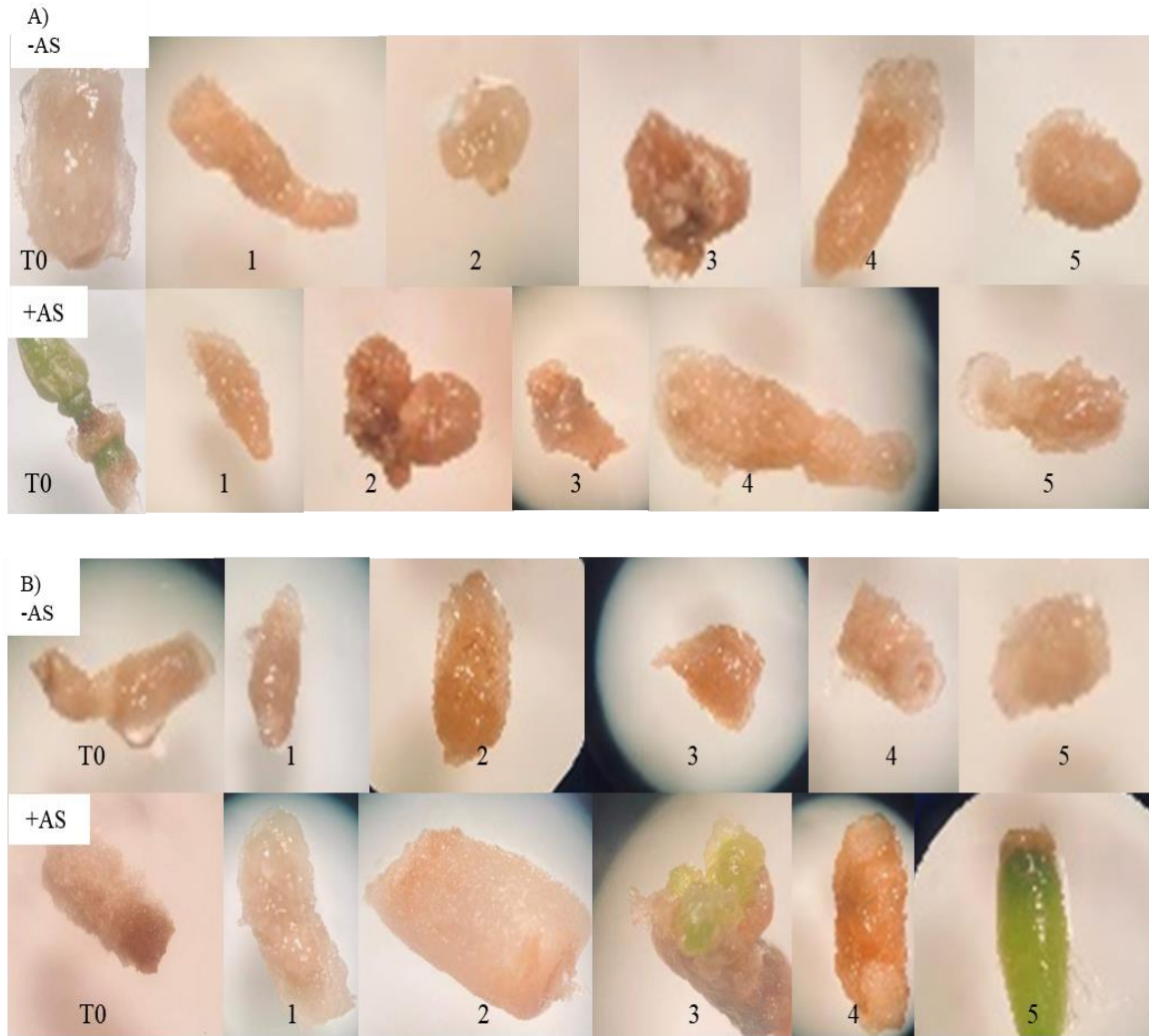


Figura 26. Callos en condiciones de luz de explantes de raíz con A) ápice y B) sin ápice, provenientes de microplantas de *Laelia autumnalis* precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas.

7.3.2 Formación de órganos

Los explantes de hoja presentaron mayor formación de órganos con respecto a los de raíz con ápice (Figura 27). Para el caso de los explantes de hoja provenientes de microplantas de (-AS) y 10^{-5} (+AS) M en algunos tratamientos presentaron organogénesis, se destaca que el tratamiento 0 (-AS testigo) tuvo mayor formación de órganos con un 60 % con respecto a los otros tratamientos (Figura 27.A). En contraste, en los explantes de raíz con ápice solo se obtuvo 20 % de formación de órganos en el tratamiento 1 (+AS BAP 0.35/ANA 0.35 mg L⁻¹

¹; Figura 27.B). Por otro lado, cabe mencionar que en los explantes de raíz sin ápice no se tuvo formación de órganos en ningún tratamiento en condiciones de luz, respecto a los explantes en condiciones de oscuridad donde se observó formación de órganos en algunos tratamientos (Figura 20.C).

En la Figura 28 se observan los órganos formados y la oxidación en el explante de hoja de microplantas precultivadas en AS y subcultivadas en auxinas/citocininas, al igual que en condiciones de luz los explantes oxidados posteriormente se desarrolló un órgano en la mayoría de los casos.

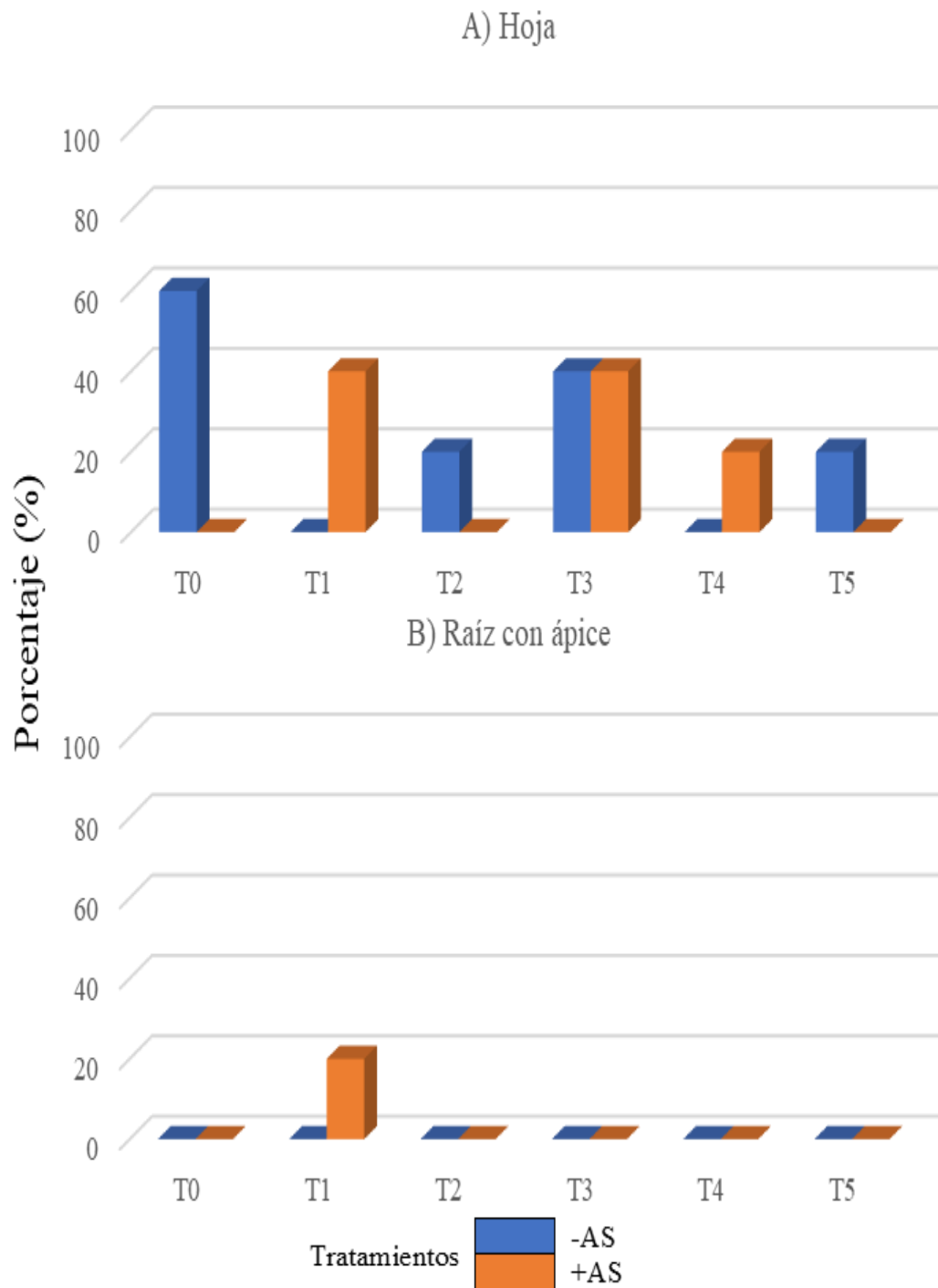


Figura 27. Porcentaje de formación de organogénesis en condiciones de luz de explantes de; A) hoja y B) raíz con ápice, provenientes de microplantas de *Laelia autumnalis* precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas.

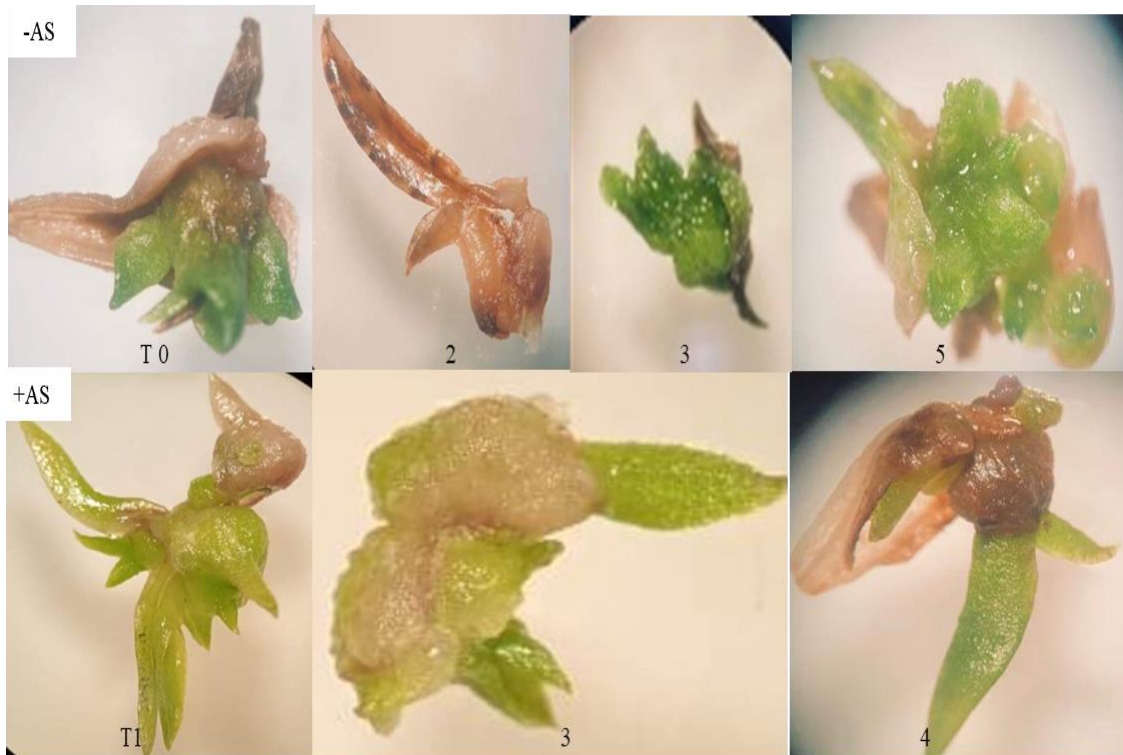


Figura 28. Organogénesis en condiciones de luz de explantes de hoja, provenientes de microplantas de *Laelia autumnalis* precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas.

7.4 Explantes sin procesos morfogénicos de microplantas de *Laelia autumnalis* precultivadas en AS

7.4.1 Explantes oxidados

En la mayoría de los explantes provenientes de microplantas en (+AS) presentaron menor oxidación con respecto a las que no estuvieron precultivadas en ácido salicílico (-AS; Figura 29).

No se presentó oxidación en los explantes de: raíz con ápice en el tratamiento 0 (+AS testigo; Figura 29.B); en los de raíz sin ápice en los tratamientos 0 (+AS testigo), 1 (+AS BAP 0.35 /ANA 0.35 mg L⁻¹) y 5 (+AS BAP 1.05 mg L⁻¹; Figura 29.C) y en los de hoja en el tratamiento 2 (+AS BAP 0.525 /ANA 0.35 mg L⁻¹; Figura 29.A).

La Figura 30 muestra los explantes de hoja completa, raíz con ápice y sin ápice oxidados, ninguno tuvo proceso morfogénico que posteriormente se necrosaron.

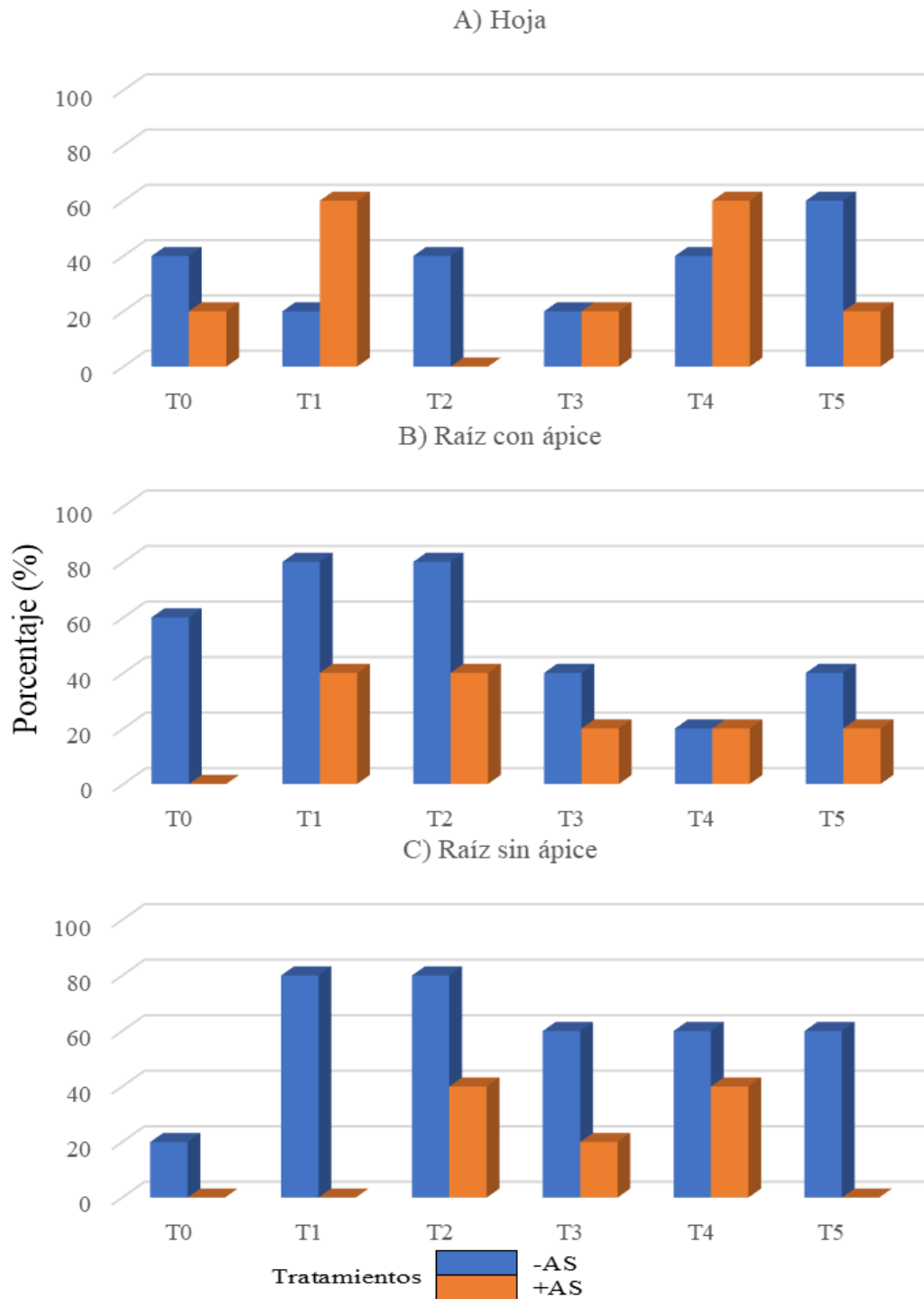


Figura 29. Porcentaje de la cuantificación de la oxidación en condiciones de luz de explantes de; A) hoja, B) raíz con ápice y C) raíz sin ápice, provenientes de microplantas de *Laelia autumnalis* precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas.

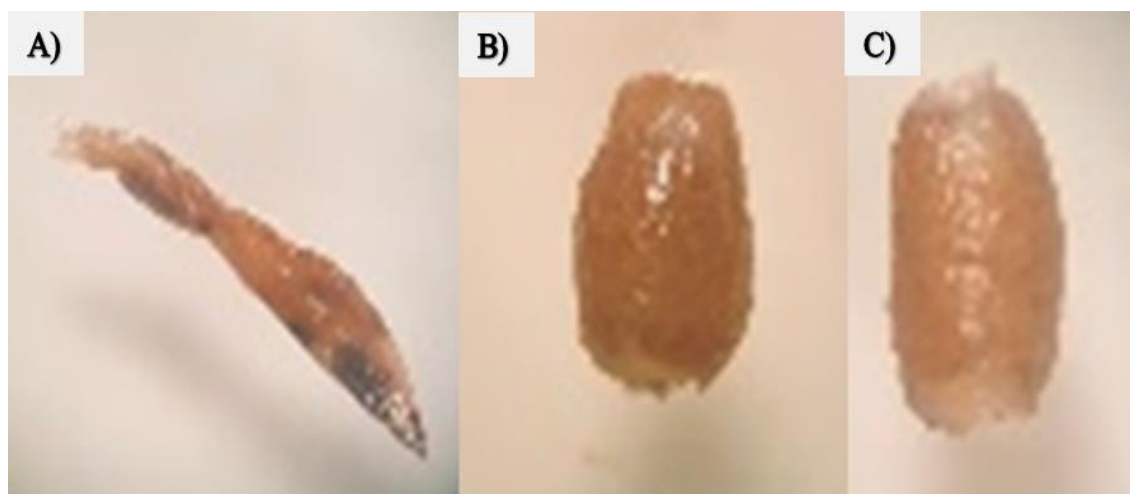


Figura 30. Oxidación en condiciones de luz de explantes de A) hoja, B) raíz con ápice y C) raíz sin ápice, provenientes de microplantas de *Laelia autumnalis* precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas.

7.4.2 Explantes verdes e incoloros

Se destaca que los explantes que no presentaron proceso morfogénico ni se oxidaron permanecieron verdes o incoloros, y en presencia de luz no presentaron un patrón de respuesta (Cuadro 4).

En los tratamientos 1 (-AS BAP $0.35/ANA 0.35 \text{ mg L}^{-1}$), 2 (+AS BAP $0.525/ANA 0.35 \text{ mg L}^{-1}$) y 3 (-AS y +AS ANA $0.7/2,4-D 0.7 \text{ mg L}^{-1}$) hubo 20 % de explantes verdes y en el tratamiento 4 (-AS ANA $0.35/TDZ 1.05 \text{ mg L}^{-1}$) 60 %. Los explantes etiolados se observaron en los tratamientos 1 (-AS BAP $0.35/ANA 0.35 \text{ mg L}^{-1}$), 2 (+AS BAP $0.525/ANA 0.35 \text{ mg L}^{-1}$), 4 (+AS ANA $0.35/TDZ 1.05 \text{ mg L}^{-1}$) y 5 (-AS BAP 1.05 mg L^{-1}) con 20 % y en los tratamientos 0 (+AS testigo) y 5 (+AS BAP 1.05 mg L^{-1}) un 60 % (Cuadro 4).

Los explantes de raíz con ápice que permanecieron verdes fueron los que estuvieron en los tratamientos 0 (+AS testigo), 2 (+AS BAP $0.525/ANA 0.35 \text{ mg L}^{-1}$) y 5 (-AS y +AS BAP 1.05 mg L^{-1}) con un 20 %. Los explantes etiolados (incoloros) en el tratamiento 0 (-AS testigo) tuvieron un 20 % (Cuadro 4). Los explantes de raíz sin ápice permanecieron verdes solo en el tratamiento 0 (-AS testigo) con un 40 % (Cuadro 4).

La Figura 31 muestra los explantes de hoja completa, raíz con ápice y sin ápice verdes e incoloros, ninguno tuvo procesos morfogénicos, sin embargo, cabe la posibilidad que los explantes verdes con mayor tiempo pudieran desarrollar algún proceso morfogénico.

Cuadro 4. Cuantificación de verde sin proceso e incolora en condiciones de luz de explantes de; A) hoja B) raíz con ápice, y C) raíz sin ápice, provenientes de microplantas de *Laelia autumnalis* precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas.

Tratamiento	Hoja		Raíz con ápice		Raíz sin ápice	
	Verdes sin proceso	incoloras	Verdes sin proceso*	incoloras	Verde sin proceso	incoloras
0-AS	0	0	0	20	40	0
0+AS	0	60	20	0	0	0
1-AS	20	20	0	0	0	0
1+AS	0	0	0	0	0	0
2-AS	0	0	0	0	0	0
2+AS	20	20	20	0	0	0
3-AS	20	0	0	0	0	0
3+AS	20	0	0	0	0	0
4-AS	60	0	0	0	0	0
4+AS	0	20	0	0	0	0
5-AS	0	20	20	0	0	0
5+AS	0	60	20	0	0	0

*Porcentaje.



Figura 31. Verde en condiciones de luz de explantes de A) hoja, B) raíz con ápice y C) raíz sin ápice, provenientes de microplantas de *Laelia autumnalis* precultivadas en ácido salicílico 0 (-AS) y 10^{-5} (+AS) M y subcultivados en auxinas/citocininas.

8 DISCUSIÓN

La biotecnología es una alternativa para la reproducción y escalamiento de organismos para mantener la biodiversidad; especialmente la morfogénesis permite obtener gran número de ejemplares a partir de poco material biológico sin perturbar hábitats naturales.

Se ha establecido que los tipos de explantes, concentraciones y combinación de reguladores del crecimiento vegetal tienen una función importante durante la propagación *in vitro* de diferentes orquídeas (Arditti y Ernst 1993). Ya que la presencia de hormonas en las células de las plantas, les brindan la viabilidad necesaria para desarrollar rutas morfogénicas, donde es necesaria la división y la elongación celular; además, en condiciones *in vitro*, se ha reportado que dichas células bajo ciertos niveles hormonales comienzan procesos de diferenciación (Aspiazu, 2014). El balance hormonal más utilizado y recomendado para inducir la división y la elongación celular en los procesos morfogénicos son las citocininas y auxinas respectivamente mismas que se observó que inducen callos o brotes de *novo* en *L. autumnalis* (Figuras 19, 21 y 26, 28) y la respuesta depende de las dosis de combinación (Figuras 18, 20 y 25, 27), además la respuesta fue mediada por el precultivo en AS de las microplantas de donde se obtuvieron los explantes evaluados (Figuras 18. A, B y C, y 25A, B y C).

Se obtuvieron más callos que brotes de *novo*, especialmente en explantes de raíces con respecto a los explantes de hoja, destacando la formación de callos de hasta 100 % en explantes de raíz con y sin ápice en condiciones de oscuridad y en condiciones de luz hasta un 80 % (Figuras 18 y 25), por lo que la oscuridad favorece los procesos morfogénicos en explantes de raíz es esta especie, algunos trabajos ya habían reportado los beneficios de las condiciones en oscuridad para procesos morfogénicos así, Moradi *et al.* (2016) reportan que en explantes en oscuridad resultó en una mejor inducción de embriones somáticos que en condiciones de luz. Gow *et al.* (2010) reportaron que 60 días de oscuridad era el período de inducción más adecuado para la formación directa de embriones en *Phalaenopsis*. Además, el efecto positivo de la oscuridad sobre la embriogénesis somática ha sido reportado en algunas orquídeas como *Phalaenopsis*, *Oncidium* y *Coelogyne cristata*. (Chen *et al.*, 2000; Gow *et al.*, 2009, 2010; Naing *et al.*, 2011), por esta razón se tienen bajos porcentajes de

brotos de *novo* en este tipo de explante (es decir, los que tuvieron callo no tuvieron hasta ese momento brotes de *novo*; Figura 18). En hoja se presenta mayor formación de brotes de *novo* que callos, aunque en menores porcentajes por la oxidación (Figuras 20.B y 27.B), y en general poca información hay de organogénesis en *L. autumnalis*.

Para el caso de formación de callo Huan *et al.* (2004), reportaron que los cultivos de callos de orquídeas son limitados, por ejemplo, Torres (2020) encontro que en las hojas de *Dracula vampira* el uso de 2,4-D no indujeron callo; resultados similares fueron reportados por Janarthanam y Seshadri (2008), que mencionan que algunas especies no responden adecuadamente a la presencia de 2,4-D en el medio de cultivo para la formación de callo. Cabe la posibilidad que en otras especies el 2,4-D solo o en combinación con otras fitohormonas sí pueda coadyubar para inducir callo como los reportaron Chen y Chang (2000).

Sin embargo, en los resultados de la presente investigación, como en el caso del tratamiento 3 (+AS ANA 0.7/2,4-D 0.7 mg L⁻¹; Figuras 18.B y 25.B) donde la formación de callo fue de 20 % en explantes de hoja, mientras que en los no precultivados en AS no se obtuvo callo; para el caso de los tratamientos en condiciones de oscuridad como de luz si hubo inducción de callo aunque fue baja posiblemente por el precultivo en AS (Figuras 18.B y 25.B).

Fajardo *et al.* (2015), reportan que la adición de AS al medio de cultivo aceleró la formación de callos en clones de cacao, por ello como se observa en los resultados del presente estudio en los tres tipos de explantes que provenían de microplantas precultivadas en AS favorecieron la inducción de formación de callo, principalmente en raíz (Figuras 18.A, B y C y 25.A, B y C), como reporta Hernández (2022), en *L. autumnalis* donde encontró la formación de callo tanto en hoja como de raíz; y con ello podemos observar que el mejor explante para inducir la formación de callo en *L. autumnalis* es la raíz.

Por otro lado, según Meza (2013), en concentraciones adecuadas de bencil amino purina (BAP) provoca un crecimiento en forma de callosidad, esto concuerda con los resultados del presente estudio donde en el tratamiento 5 (-AS y +AS BAP 1.05 mg L⁻¹) que solo contenía BAP promovió callos en los tres tipos de explantes tanto en condiciones de luz como de oscuridad (Figuras 18 y 25). También Gil *et al.* (2019), reportan mayor porcentaje de callos

en adición de BAP en *C. trianae* Linden & Rehb.f y formación de protocormos en la orquídea *Chloraea crispa*, bajo condiciones de oscuridad.

Otras combinaciones de fitohormonas que han formado callo embriónico en el medio MS son ácido naftalénacético (ANA) y 6-BAP en *L. anceps ssp. dawsonii* a partir de semillas en fotoperiodo de 16 h (Lee *et al.*, 2010). En esta investigación la combinación del tratamiento 4 (-AS y +AS ANA 0.35/TDZ 1.05 mg L⁻¹) indujo formación de callo aunque se utilizó TDZ en lugar de BAP, tanto, en condiciones de luz (Figura 25.A y C) como de oscuridad (Figura 18. A, B y C), destaca que el efecto fue mayor en los explantes que provenían de microplantas precultivadas en AS en condiciones de oscuridad.

En el estudio de Hernández (2022), reporta organogénesis en explantes de hoja en *L. autumnalis* en combinación de ANA/BAP. Esto coincide con los resultados de la presente investigación donde en los tratamientos 1 (BAP 0.35/ANA 0.35 mg L⁻¹) y 2 (+AS BAP 0.525/ANA 0.35 mg L⁻¹) se obtuvieron brotes de *novo* tanto en condiciones de oscuridad y luz (Figuras 20.B y 27.B), pero siempre fueron mayores en condiciones de oscuridad. Además, en *Laelia speciosa* se obtuvieron brotes con la combinación de estas fitohormonas (Sarabia-Ochoa, 2010) y en *Prosthechea citrina* se observó formación de brotes, incremento de plántulas por explante, con brotes y desarrollo de hojas y raíces en combinación de ANA/BAP (Cazarez *et al.*, 2016).

Al igual que en la formación de callos se reporta que BAP favorece a la formación de brotes en *Dendrobium nobile* Lindl (De Menezes *et al.*, 2016), y en *Phalaenopsis* spp. Donde incrementó en el número de yemas por brotes (Duan *et al.*, 1996) al igual que en *Cymbidium aloifolium* L. (Nayak *et al.*, 1998). Esto coincide con la presente investigación en el tratamiento 5 (BAP 1.05 mg L⁻¹) donde BAP formó brotes de *novo* tanto en condiciones de luz como de oscuridad (Figuras 20.B y 27.B).

Uno de los problemas más serios para la morfogénesis en el cultivo *in vitro*, es la oxidación la cual se puede presentar cuando se extrae el explante de la planta madre, la primera respuesta del tejido es la exudación de compuestos fenólicos (Tisserat y Jones 1999) en el sitio de corte provocando un severo oscurecimiento del tejido, ya que estos son lesionados; también se puede deber a otros factores ambientales como: explantes senescentes, la

intensidad de luz, herbicidas, el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia, composición del medio de cultivo, volumen y calidad del frasco de cultivo (George, 1993; Tabiyeh *et al.*, 2006; Van *et al.*, 2006; Pompeu *et al.*, 2008 y Abdelwahd *et al.*, 2008), lo que limita la respuesta del explante, y generalmente da como resultado la muerte del mismo (George, 1996; Tang y Newton, 2004 y Pompeu *et al.*, 2008). En las orquídeas se presenta este problema sobre todo con explantes de hoja como fue reportado en *Laelia autumnalis* (Hernández, 2022). Por ello se han propuesto algunas estrategias para disminuir la oxidación y mantener la capacidad de regeneración de explantes, como por ejemplo el uso en el medio de agentes antioxidantes.

Es probable que el AS tenga alguna función reguladora sobre el balance de la oxidación/reducción de las células vegetales, y ello tal vez explique la capacidad del AS de inducir respuestas 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 ERO (Raskin, 1992 en Benavides-Mendoza, 2002) que se ha visto cuando un tejido se oxida es por la generación excesiva de ERO (Karp, 1998).

En trabajos recientes se reportó que el uso de AS en precultivos de *L. autumnalis* para inducir procesos morfogénicos disminuyó la oxidación en explantes de hoja y raíz (Hernández, 2022); mismos efectos se encontraron en la presente investigación donde el precultivo con AS disminuyó el porcentaje de explantes oxidados de hoja (Figuras 23 y 30), cabe destacar que los explantes de raíz tuvieron menos oxidación que los de hoja (Figuras 22.A, C y 29.A, C), y además los explantes que se cultivaron en luz tuvieron mayor porcentaje de oxidación que los cultivados en total oscuridad (Figuras 22 y 29), retomando que la luz favorece o promueve la oxidación (George, 1993; Tabiyeh *et al.*, 2006; Van *et al.*, 2006; Pompeu *et al.*, 2008 y Abdelwahd *et al.*, 2008).

Probablemente el BAP también intervino en la disminución de la oxidación ya que como se ha reportado retarda la senescencia (Zavaleta-Mancera *et al.*, 2007; Schiller y Magnitskiy, 2019). Como se observó en el tratamiento 5 (BAP 1.05 mg L⁻¹; Figura 22) con alta concentración de BAP, lo que pudo coadyuvar junto con el precultivo en AS a evitar la oxidación especialmente en el caso de hojas que son el explante con mayor oxidación, esto

ya se había observado aun en otras concentraciones de BAP (Hernández-Bello y Mora-Herrera, 2021b; Hernández-Bello *et al.*, 2021a), se ha reportado que el BAP, participa en el fenómeno denominado “regreening” (reverdecimiento) y que se da en oscuridad (Zavaleta-Mancera *et al.*, 2007), lo que coincide con los resultados obtenidos de la presente investigación, donde los explantes cultivados en total oscuridad presentaron menor oxidación que los cultivados en luz (Figuras 22 y 29).

Esto confirma que el BAP pudo retrasar la senescencia en estos explantes como se encontró en el trigo (Xie *et al.*, 2004) en respuesta al BAP en oscuridad, como también se ha demostrado en los floretes de brócoli (Costa *et al.*, 2005), maíz (He *et al.*, 2005) y arroz (Ookawa *et al.*, 2004). Se piensa que esta acción se da a través de la restauración de los componentes de la fotosíntesis (Guamet *et al.*, 1991, en Zavaleta-Mancera *et al.*, 2007; Figura 23).

En este trabajo se observó que algunos explantes permanecieron verdes o etiolado (los que no tuvieron proceso morfogénico ni se oxidaron), no se encontraron reportes que mencionen este tipo de explantes, y aunque no fueron significativos, es importante resaltar que se dieron principalmente en el explante de hoja tanto en condiciones de oscuridad como de luz (Cuadros 3 y 4, Figuras 24 y 31). Esto confirma que este explante es más susceptible al estrés por lo que no se desarrolla ante el estímulo hormonal o es más difícil obtener procesos morfogénicos en este explante como en esta especie.

9 CONCLUSIONES

- La propagación en medio MS al 50 % de sales es adecuada para la propagación y desarrollo de *L. autumnalis*.
- El precultivo de microplantas de *L. autumnalis* en AS e incubación en oscuridad reduce la oxidación de los explantes utilizados para inducir procesos morfogénicos.
- Los explantes de microplantas de *L. autumnalis* precultivadas en AS induce la formación de procesos morfogénicos mediados por auxinas y citocininas incubadas en oscuridad.
- El explante de raíz es el más apto para inducir callo en microplantas de *L. autumnalis*.
- El explante de hoja es apto para inducir brotes de *novo* en microplantas de *L. autumnalis*.
- La combinación de la auxina ANA y la citoquinina BAP es la más indicada para inducir procesos morfogénicos en *L. autumnalis*

10 BIBLIOGRAFÍA

- Abdelwahd R., Hakam N., Labhilili M., y Udupa S. (2008). Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. *African Journal of Biotechnology*. 7(8): 997-1002. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/58590#:~:text=Use%20of%20an%20adsorbent%20and%20antioxidants%20to%20reduce,MS%20medium%20supplemented%20with%200.5%20mg%20F1%20-naphthaleneacetic%20acid>.
- Abreu M. E., y 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>.
- Alva S., Menéndez A., Oropeza M., y Vargaz T. (2010). Cultivo de tejidos vegetales. Guía De Cultivo de tejidos vegetales. Universidad Central de Venezuela. Escuela de Biología. Departamento de Botánica.
- Arditti J. (1977). Clonal propagation of orchids by means of tissue culture- a manual. En: J. Arditti (ed) *Orchid Biology, Reviews and Perspectives*, I. Cornell Univ. Press, Ithaca. 203-293. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-009-0103-2_25.
- Arditti J. (2008). *Micropropagation of Orchids* (2nd ed.). Oxford: Blackwell Publishing. Publicado electrónicamente: 13 marzo 2010. <https://doi:10.1093/aob/mcq019>.
- Arditti J., y Ernst R. (1993). *Micropropagación de orquídeas*. Wiley Publishers, Nueva York Bhadra SK.
- Aspiazu R. (2014). Propagación vegetativa de cebollines de banano (*Mussa paradisiaca*) variedad Cavendish mediante la aplicación de tres hormonas en el cantón Buena Fe. Undegraduate thesis. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. <http://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/488>.
- Ávila-Díaz I., Oyama K., Gómez-Alonso C., y Salgado-Garciglia R. (2009). *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa* en peligro de extinción. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 99(3): 335-343. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9609-8>.
- Ávila-Díaz I., y Salgado-Garciglia. R. (2006). Propagación y mantenimiento de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Ciencias Biológicas*. 8(1): 138-149.

<https://www.biologicas.umich.mx/index.php?journal=biologicas&page=article&op=view&path%5B%5D=9#:~:text=Con%20el%20presente%20estudio%20se%20prende%20colaborar%20en,de%20semillas%2C%20fueron%20usados%20comoexplan tes%20para%20su%20multiplicaci3n.>

Azofeifa Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*. 20(1): 153-175. https://www.researchgate.net/publication/41035142_Problemas_de_oxidacion_y_os curecimiento_de_explan tes_cultivados_in_vitro.

Baleriola M. L. (2018). Morfogénesis *in vitro* en cultivares del género *Citrullu*. Cultivo *in vitro*. Instituto de Biología Molecular y Celular de plantas. Universidad politécnica de valencia. 6: 40. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/107015/BALERIOLA%20-%20Morfog%3%A9nesis%20in%20vitro%20en%20cultivares%20del%20g%C3%A9nero%20Citrullus.pdf?sequence=1>.

Barrera V. D. G., Chávez-Ávila V. M., y Sandoval E. (2005). Propagación *in vitro* vía organogénesis indirecta de *Laelia speciosa* (orchidaceae) especie en peligro de extinción. En Memoria del XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, 18 a 23 de septiembre, Mérida, Yucatán. https://smbb.mx/congresos%20smbb/merida05/TRABAJOS/AREA_II/CII-22.pdf.

Bechtel P. G. (1990). The *Laelias* of México. *American Orchid Society Bulletin*. 59: 1229-1234. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=6414094&pid=S0187-7380201000040001000002&lng=es.

Bedoya P. C., y Ríos R. A. (2010). Inducción de la embriogénesis somática en *Crinum X Powellii* “album” (Amaryllidaceae). Universidad Tecnológica de Pereira Facultad de Tecnologías. Escuela de Tecnología Química Pereira [Trabajo de grado]. <https://hdl.handle.net/11059/2053>.

Beltrán-Rodríguez L.A., Martínez-Rivera B., y Paulo-Maya A., (2012). “Etnoecología de la flor de catarina *Laelia autumnalis* (La Llave & Lex.) Lindl. (Orchidaceae) en una comunidad campesina al sur del estado de Morelos, México: conservando un recurso y preservando saberes populares”. *Etnobiología*. 10(1): 1-17. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5294459>.

- 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. <https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Salicilicoeagenteseñalresitenciaplantas.pdf>.
- Benega R., Martínez J., Daquinta M., Arias E., Hidalgo M., González M. C., y Isidró M. (2000). Efecto del Thidiazuron sobre la formación de embriones y regeneración de plántulas en callos recalcitrantes de anteras en piña. *Cultivos Tropicales*. 21(3): 47-50. <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193215152008.pdf>.
- Calderón de Rzedowski, G., y Rzedowski J. (2010). Flora fanerogámica del Valle de México. Edición digital. Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. 1-38.
- Carvajal C. C. (2018). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina legal de Costa Rica*. 36(1): 91-100. <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2020/04/1002562/art12v36n1.pdf>.
- Cazarez F. T. L., Graciano L. J de J., Solís G. S., Ramírez D. B., Nájera L. J. A., y Montoya A. J. B. (2016). Propagación *in vitro* de la orquídea *Prosthechea citrina* (La Llave & Lex.) W. E. Higgins nativa del estado de Durango, México. 67: 19-25. <https://investigacion.uaa.mx/RevistaIyC/archivo/revista67/Articulo%203.pdf>.
- 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. ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/277003398 ESTRATEGIA_ESTATAL_Y_PROGRAMA_DE_PROTECCION_A_LA_BIODIVERSIDAD_DEL_ESTADO_DE_MEXICO_Y_EL_CONVENIO SOBRE_DIVERSIDAD_BIOLÓGICA#:~:text=Este%20documento%20que%20presenta%20el%20Gobierno%20del%20Estado,protecci%C3%B3n%20de%20la%20biodiversidad%20de%20un%20modo%20integral.
- CEPAL-PNUMA. (2002). Comisión Económica para América Latina y el Caribe, Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente 2002. Cumbre Mundial sobre el Desarrollo Sostenible, Johannesburgo, Sudáfrica, 2-11 de septiembre.

- Chase M.W., Cameron K.M., Barrett R.L., y Freudenstein J. V. (2003). DNA data and Orchidaceae systematics: A new phylogenetic classification. En: K.W. Dixo, Hágsater E.; M. A Soto Arenas; G. A. Salazar Chávez; R. Jiménez Machorro, M. A. López Rosas & R. L. Dressler. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín. México.
- Chen J. T., y Chang W. C. (2000). Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae). *Plant Science*. 160: 87–93. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00367-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00367-8).
- Chen J. T., y Chang W. C. (2003). Effects of GA3, ancymidol, cycocel and paclobutrazol on direct somatic embryogenesis of *Oncidium in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 72: 105-108. <https://doi.org/10.1023/A:1021235700751>.
- Chen J. T., y Chang W. C. (2004a). Induction of repetitive embryogenesis from seed-derived protocorms of *Phalaenopsis amabilis* var. Formosa Shimadzu. *In vitro Cell, Developmental Biolgy Plant* 40: 290-293. <https://doi.org/10.1079/IVP2003527>.
- Chen J. T., y Chang W. C. (2004b) TIBA affects the induction of direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Oncidium*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 79: 315-320. <https://doi.org/10.1007/s11240-004-4613-5>.
- Chen L. M., Cheng J. T., Chen E. L., Yiu T. J., y Liu Z. H. (2002). Naphtaleneacetic acid suppresses peroxidase activity during the induction of adventitious roots in soybean hypocotyls. *Plant Physiology*. 159(12): 1349-1354. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682013000100007.
- Chen Y., Kenaschuck E. O., y Procnier J. D. (1998). Plant regeneration from another culture in Canadian cultivars of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Euphytica*. 102: 183-257. <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193215152008.pdf>.
- Chin-Chi L. (1986). *In vitro* Culture of Flower stalk internodes of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis*. *Lyndleyana*. 1: 158-163. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1571698599390212480>.
- Chugh S., Guha S., y Rao I. U. (2009). Micropropagación de orquídeas: Una revisión sobre la potencial de diferentes explantes. *Ciencias hortícolas*. 122(4): 507-520. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.07.016>.

- Chung H. H., Chen J. T., y Chang W. C. (2005). Las citoquininas inducen somática directa embriogénesis de *Dendrobium chiengmai* pink y posterior regeneración vegetal. *Biología celular y del desarrollo in vitro Planta*. 41(6): 765-769. <http://doi.org/10.1079/IVP2005702>.
- CONABIO (31 de julio de 2022). ¿Qué es la biodiversidad?, Biodiversidad mexicana, Biodiversidad: nuestra defensa natural más fuerte contra el cambio climático. CONABIO. https://www.biodiversidad.gob.mx/biodiversidad/que_es.html.
- Condemarín-Montealegre C., Chico-Ruíz J., Vargas-Artaega C. (2007). Efecto del ácido indol butírico (IBA) y 6-bencilaminopurina (BAP) en el desarrollo *in vitro* de yemas axilares de *Encyclia microtos* (Rchb.f.) Hoehne (Orchidaceae). *Lankesteriana Internal Journal Orchidology* (Costa Rica). 7(1-2): 247-254. <https://doi.org/10.15517/lank.v7i1-2.19513>.
- Costa M.L., Civello P.M., Chaves A.R., Martínez G.A. (2005). Effect of ethephon and 6-benzylaminopurine on chlorophyll degrading enzyme and a peroxidase-linked chlorophyll bleaching during post-harvest senescence of broccoli (*Brassica oleraceae* L.) at 20 degrees C. *Postharvest Biology and Technology*. 35(2): 191-199. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.07.007>.
- De Menezes G., Leticia P. S., Machado M. de F., Ballesta P. M., Milaneze G. M. A., y Claudete A. (2016). Suplementos orgánicos para el cultivo *in vitro* del híbrido *Laelia cattleya* (Orchidaceae). *Idesia* (Arica). 34(1): 47-54. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292016000100006>.
- Diario Oficial de la Federación. (25 de junio de 2020). Programa Sectorial Derivado Del Plan Nacional de Desarrollo 2019-2024. Diario Oficial de la Federación. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5595549&fecha=25/06/2020#gsc.tab=0.
- Dimensiones de la vida humana. (13 de octubre de 2013). La Morfogénesis. Word Press. <https://dimensionesdelavidahumana.wordpress.com/2013/10/13/la-morfogenesis/>.
- Duan J. X., Chen H., y Yazawa S. (1996). *in vitro* Propagation of *Phalaenopsis* via Culture of Cytokinin-Induced Nodes. *Journal of Plant Growth Regulation*. 15: 133-137. <https://doi.org/10.1007/BF00198928>.

- Dudits D., Bõgre L., y Gyõrgyey J. (1991). Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *Journal Cell Science*. 99(3): 473-482. <https://doi.org/10.1242/jcs.99.3.473>.
- Dutra D., Johnson T. R., Kauth P. J., Stewart S. L., Kane M. E., y Richardson L. (2008). Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*. 94: 11-21. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-008-9382-0>.
- Eckardt N. A. (2003). A new classic of cytokinin research: cytokinin-deficient *Arabidopsis* plants provide new insights into cytokinin biology. *The Plant Cell (USA)*. 15(11). <https://2489-2492>. <https://doi.org/10.1105/tpc.151110>.
- 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. (2019). Efecto de la extracción sobre la dinámica poblacional y desempeño individual de *Laelia autumnalis* (La Llave & Lex.) Lindl. en Tenancingo, estado de México Doctor en Ciencias Naturales [Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma del Estado de Morelos]. Centro Universitario UAEM Tenancingo.
- Emeterio-Lara A., Palma-Linares V., Vázquez-García L. M., y Mejía-Chávez 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>.
- Endara L., Grimaldi D., y Roy B. (2010b). Lord of the flies: pollination of *Dracula* orchids. *Lankesteriana*. 10(1). https://www.researchgate.net/publication/276664523_Lord_of_the_flies_pollination_of_Dracula_orchids.
- Endara L., Williams N., y León-Yáñez S. (2010a) Patrones de endemismo de orquídeas endémicas ecuatorianas: perspectivas y prioridades para la conservación. In: Pridgeon A M, Suarez JP (eds) *Proceedings of the Second Scientific Conference on Andean Orchids*. Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador. 63-70. https://www.researchgate.net/publication/319040057_PATRONES_DE_ENDEMIS

MO_DE_ORQUIDEAS_ENDEMICAS_ECUATORIANAS_PERSPECTIVAS_Y_PRIORIDADES_PARA_LA_CONSERVACION.

- Fajardo R. L., Silva P. J. J., Viera T. Y., y Cobas R. Y. (2015). Efecto del ácido salicílico sobre la formación de callos en tres clones de *Theobroma cacao* L. *Biotechnología Vegetal*. 15(4): 217-225. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/499>.
- Flores-Escobar G., Legaria-Solano J. P., Gil-Vásquez I., y 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-Palacios A., y Valencia-Díaz S. (2007). "Local illegal trade reveals unknown diversity and involves a high species richness of wild vascular epiphytes". *Biological Conservation*. 136(3): 372-387. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2006.12.017>.
- Freire S. M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotechnología Vegetal*. 3(4): 195-209. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/263/html>.
- George E. F., y Sherrington P. D. (1984). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Ltd. Eversley, England. 1333.
- George, E. (1993). *Plant propagation by tissue culture; part 1. The technology*. 2 ed. Exegetics Limited. England. 574.
- George, E. (1996). *Plant propagation by tissue culture; part 2. In Practice*. 2 ed. Exegetics Limited. England. 1361.
- Gil C. A. I., Ariza C. C. A., Castillo T. L. M., Salgado D. L. E., Banda S. L., y Vanegas M. L. E. (2019). Inducción de organogénesis *in vitro* con 6-bencilaminopurina en *Cattleya trianae* Linden & Rchb.f. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*. 22(2): 275. <https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/1275>.
- Gisbert D. M. C. (2011). *Morfogénesis: la ruta organogénica versus la ruta embriogénica*. Universitat Politècnica de València. <http://hdl.handle.net/10251/11526>.
- Gisbert D. M. C., y Picó M. B. (2015). *Micropropagación*. Universitat Politècnica de València. <http://hdl.handle.net/10251/51895>.

- Gispert M. I. (30 de julio de 2010). Biodiversidad. Universidad Nacional Autónoma de México Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, México, Distrito Federal. https://www.dgdc.unam.mx/assets/cienciaboletos/cb_14.pdf.
- Gow P. W., Chen J. T., y Chang, W. C. (2010). Mejora de la embriogénesis somática directa y el crecimiento de plántulas a partir de explantes de hojas de *Phalaenopsis* mediante el Ajuste del período de cultivo y la longitud del explante. *Acta Physiologiae Plantarum*. 32: 621-627. <https://10.1007/s11738-008-0243-6>.
- Gow W.P., Chen J. T., y Chang W. C. (2009). Enhancement of direct somatic embryogenesis and plantlet growth from leaf explants of *Phalaenopsis* by adjusting culture period and explant length. *Acta Physiologiae Plantarum*. 32: 621-627 <https://10.1007/s11738-009-0438-5>.
- Hágsater E. y Stewart J. (1986). "Estrategias para la conservación de Orquídeas", *Revista Orquídeas*, 10(1): 213-221.
- Hágsater E., Soto Arenas M. A., Salazar Chávez G. A., Jiménez M. R., López R. M. A., y Dressler R. L. (2005). *Las orquídeas de México*. Instituto Chinoín. Productos Farmacéuticos S.A de C.V. México.
- Halbinger F. (1993). *Laelias* de México. Asociación Mexicana de Orquideología, A.C. (Ed.) México, D.F. 71. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=6414112&pid=S0187-7380201000040001000011&lng=es.
- Halbinger F., y Soto. A. M. (1997). *Laelias* of Mexico. *Orquídea (Méx.) Revista del Herbario AMO*. 15: 166.
- Hayat S., y Ahmad A. (2007). *Salicylic Acid: A Plant Hormone*. Dordrecht, The Netherlands: Springer. 247-276. https://link.springer.com/chapter/10.1007/1-4020-5184-0_1.
- He P., Osaki M., Takebe M., Shinano T., y Wasaki J. (2005). Endogenous hormones and expression of senescence-related genes in different senescent types of maize. *Journal Experimental Botany*. 56(414): 1117-1128. <https://academic.oup.com/jxb/article/56/414/1117/551494>.
- Hernández B. M. (2022). Evaluación de segmentos de hoja y raíz de *Laelia autumnalis* preincubados en ácido salicílico para la inducción de organogénesis. [Tesis para

- obtener el título de: Licenciatura en biología]. Instituto Tecnológico Superior de Zacapoaxtla.
- Hernández-Bello M. y Mora-Herrera M. E. (1-3 de diciembre 2021b). Evaluación de raíz de microplantas de *Laelia autumnalis* precultivadas en ácido salicílico en la organogénesis. 3º congreso Mexicano de Fisiología Vegetal, 1º congreso internacional, Tepatitlán de Morelos, Jalisco.
- Hernández-Bello M., Olivares-Aguilar J. M, García-Vara A., Mora-Herrera M. E. (10-12 de noviembre 2021a). Evaluación de segmentos de hoja de *Laelia autumnalis* para uso en organogénesis mediado por ácido salicílico. Congreso de Las reuniones nacionales de investigación pecuaria, agrícola, forestal y acuícola pesquera, Ciudad de México.
- Huan L. V., Takamura T., y Tanaka M. (2004) Formación de callos y planta. Regeneración del callo a través de estructuras embrionarias somáticas en *Cymbidium* orquídea. 166: 1443-1449. <https://doi:10.1016/j.plantsci.2004.01.023>.
- Huang Y. W., Tsai Y. J., Cheng T. C., Chen J. J. y Chen F. C. (2014). Físico Heridas y proliferación de células madre embriogénicas estimuladas por etileno y plántulas regeneración en cuerpos similares a protocormos de orquídeas *phalaenopsis*. Genética y Investigación molecular. 13(4): 9543-9557. <http://doi.org/10.4238/2014.12.3> de noviembre.
- Janarthanam B., y Seshadri S. (2008). Regeneración de plántulas a partir de callos derivados de hojas de *Vanilla planifolia* Andr. Biología celular y del desarrollo *in vitro*- Planta. 44(2): 84-89. <http://doi.org/10.1007/s11627-008-9123-4>.
- Karp G. (1998). Biología celular y molecular. Traducido por Dr. J. Pérez. UNAM. McGraw-Hill Interamericana. México D.F. México. 746 p.
- Kaur S., y Bhutani K. K. (2013). *In vitro* propagación masiva de ornamental y medicinalmente importante Celógino Flaccida Lindl. a través de segmentos de pseudobulbo. Planta Cultivo de tejidos y biotecnología. 23: 39-47. https://www.researchgate.net/publication/318657770_In_Vitro_Regeneration_of_Shoots_From_Nodal_Explants_of_Dendrobium_Chrysotoxum_Lindl.
- Knudson L. (1922). Germinación no simbiótica de semillas de orquídeas. Gaceta Botánica, LXXIII (1).

- Larqué-Saavedra A., y Martín-Mex R. (2007). Effects of salicylic acid on the bioproductivity of plants. En Hayat, S; Ahmad, A. eds. Salicylic acid a plant hormone. Springer. https://doi.org/10.1007/1-4020-5184-0_2.
- Lee E. H. E., Cerda A. L., González J. M., Iglesias–Andreu L., García R. B., Escobedo L. D., Martínez O. Y. M., Barredo P. F. A., y Santana B. N. (2010). Un protocolo de embriogénesis somática para la regeneración y caracterización *in vitro* de *Laelia anceps* ssp. *Dawsonii*. Revista fitotecnia Mexicana. 33(4): 323-332. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802010000400010.
- Lee Y. I., y Lee N. (2003) Plant regeneration from protocorm-derived callus of *Cypripedium formosanum*. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 39: 475-479. <https://doi.org/10.1079/IVP2003450>.
- Lema R. J., y Kulus D. (2014). Micropropagation of cacti-A review. *Haseltonia*. 19: 46-63. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342017000400863#B16.
- Levitus G., Echenique V., Rubinstein C., Hopp E., y Mroginski L. (2010). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Llorente-Bousquets J., y Ocegueda S. (2008). Estado del conocimiento de la biota. En *Capital natural de México*. CONABIO, México. 283-322. www2.biodiversidad.gob.mx/pais/pdf/CapNatMex/Vol%20I/I11_Estadoconocimiento.pdf.
- Lluna D. R. (2006). Hormonas vegetales: crecimiento y desarrollo de la planta. *Revista de Horticultura*. Madrid. 196: 22-26. https://www.miteco.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Hort/Hort_2006_196_2_22_27.pdf.
- López-Delgado H. A., López P., Larqué S., Delgado O., y Luisa M. (1987). Efecto del ácido acetil salicílico en el crecimiento de yemas de *Solanum cardiophyllum* (Lindl.) cultivadas *in vitro* [Tesis de doctorado, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Centro de Genética]. (PDF) Efecto del ácido acetil salicílico en el crecimiento de yemas de *Solanum cardiophyllum* cultivadas *in vitro* (researchgate.net).

- López-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.
- Luna P. R., Castañón B. A., y Raz-Guzmán A. (2011). La biodiversidad en México: su conservación y las colecciones biológicas. *Ciencias UNAM*. 103: 36-43. <https://revistacienciasunam.com/es/103-revistas/revista-ciencias-101/843-la-biodiversidad-en-mexico-su-conservacion-y-las-colecciones-biologicas.html>.
- 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>.
- Martin K P., y Pradeep A. K. (2003). Estrategia simple para el *in vitro* conservación de *Ipsea malabarica* un endémico y en peligro de extinción orquídea de los Ghats occidentales de Kerala, India. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 74:197-200. <https://doi.org/10.1023/A:1023971625994>.
- Mathur J. y Koncz C. (2005). Callus and culture regeneration. *Methods in molecular biology, Arabidopsis Protocols*. Human Press Inc. <https://doi.org/10.1385/0-89603-391-0:31>.
- Menchaca-García R. A. y Moreno-Martínez D. (2011). Conservación de orquídeas, una tarea de todos. Primera edición, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México.
- Meza J. (2013). Propagación vegetativa de plátano Dominique (*Musa paradisiaca*) bajo dos porcentajes de sombra con la aplicación de cuatro dosis de benzilaminopurina (BAP) en el cantón El Empalme provincia del Guayas. Universidad Técnica de Cotopaxi. <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/2551/1/TUTC-00088.pdf>.
- Molina A. (2004). Vocabulario en lengua Castellana y mexicana y mexicana y Castellana. Editorial Porrúa. 5: 151-152.
- Moradi S., Dianati S. D., Mostafa A., y Kourosh V. (2016). Embriogénesis somática directa en *Epipactis Veratrifolia*, una orquídea terrestre templada. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 92(1): 1-10. <https://DOI:10.1080/14620316.2016.1228434>.

- Mora-Herrera M. E. (2007). Estrés oxidativo, respuesta antioxidante y tolerancia a baja temperatura en microplantas de *Solanum tuberosum* L Doctor en Ciencias Naturales [Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México].
- Mora-Herrera M. E., y López-Delgado H. A. (17- 20 de septiembre 2012). Inducción de organogénesis en microplantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) empleando ácido acetil salicílico. XXV Congreso de la Asociación Latinoamérica de la Papa, Uberlandia, Brasil.
- Murashige T., y Skoog F. (1962). A Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
- Murkute A., y Shanti-patil M. (2003). Exudation and browning in tissue culture of pomegranate. *Agricultural Science Digest*. 23: 29-31.
- Murthy H. N., y Pyati A. N. (2001). Micropropagation of *Aerides maculosum* Lindl. (Orchidaceae). *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 37: 223-226. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0039-5>.
- Naing A. H., Chung J. D., y Lim K. B. (2011). Regeneración de plantas mediante embriogénesis somática indirecta en *Celógina Cristata* orquídea. *Revista Americana de Plantas Ciencias*. 2: 262–267. <https://doi:10.4236/ajps.2011.22028>.
- Nájar A. (6 de octubre de 2011). México pierde a sus orquídeas. BBC Mundo, Ciudad de México. http://www.bbc.com/mundo/noticias/2011/10/111006_orquidea_mexico_extincion_an.shtml#page-to.
- Nava B. J. H. (2008). Las Orquídeas del Municipio de Ocuilan de Arteaga, Estado de México. Universidad Autónoma del Estado de México. Tenancingo. [Tesis para obtener el título de Ingeniero Agrónomo en Floricultura]. Centro Universitario UAEM.
- Nayak N. R., Chand P. K., Rath S. P., Patnaik S. N. (1998). Influence of some plant growth regulators on the growth and organogenesis of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. Seed-derived rhizomes *in vitro*. *in vitro Cell and Developmental Biology Plant*. 34: 185-188. <https://doi.org/10.1007/BF02822706>.
- Novak S. D., Luna L. J., y Gamage R. N. (2014). Papel de la auxina en la orquídea. desarrollo. Señalización y comportamiento de plantas. 9(10). <http://doi.org/10.4161/psb.32169>.

- Novoa A., Motidome M., Mancini-Filho J., Linares A., Tanae M., Torres L., y Lapa A. (2001). Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (S.G. Gmelim) Howe. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 37: 373-382.
- Ogita S. (2005). Callus and cell suspension culture of bamboo plant, *Phyllostachys nigra*. *Plant Biotechnology*. 22: 119-125.
- Olivares-Aguilar J. M. (2020). Evaluación del ácido salicílico en la aclimatación *ex vitro* de microplantas de *Laelia autumnalis* (Lex.) Lind., *Epidendrum sp.* y *Encyclia sp.* Universidad Autónoma del Estado de México. Tenancingo. [Tesis para obtener el título de Ingeniero Agrónomo en Floricultura]. Centro Universitario UAEM.
- ONU. (14 de junio de 1992). Organización de las Naciones Unidas. Cumbres para la Tierra. Programa 21. Rio de Janeiro Brazil. ONU. <https://www.un.org/spanish/esa/sustdev/agenda21/agenda21spchapter15.htm>.
- ONU. (15 de septiembre de 2015). Organización de las Naciones Unidas. Transformar nuestro mundo: la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible. 15 de septiembre. Sede de las Naciones Unidas en Nueva York, EUA. ONU. https://www.un.org/ga/search/view_doc.asp?symbol=A/RES/70/1&Lang=S.
- ONU. (2020). Organización de las Naciones Unidas. Biodiversidad: nuestra defensa natural más fuerte contra el cambio climático. Naciones Unidas. <https://www.un.org/es/climatechange/science/climate-issues/biodiversity>.
- Ookawa T., Naruoka Y., Sayama A., y Hirasawa T. (2004). Cytokinin effects on ribulose 1-5 biphosphate carboxylase/ oxygenase and nitrogen partitioning in rice during ripening. *Crop Science*. 44: 2107-2115. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.2107>.
- Park S. Y., Hosakatte N. M., y Kee Y. P. (2002). Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves. *in vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 38(2): 168-172. <https://link.springer.com/article/10.1079/IVP2001274>.
- Pérez C. J. (2021). Biotecnología vegetal. Mejoramiento de cultivos ante el cambio climático. Instituto Tecnológico de costa rica. *Revistas académicas del TEC*. 14 (42): 3-5. https://revistas.tec.ac.cr/index.php/investiga_tec/article/view/5985/5716.
- Pérez P. J. L., García R. L., Veitía R. N., Bermúdez C. I., y Collado L. R. (2013). Efecto del ácido 2,4-diclorofenoxiacético en la respuesta embriogénica de soya cultivar incasoy-

27. Cultivos Tropicales. 34(3): 40-44. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana, Cuba. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193227533006>.
- Plascencia R., Castañón A., y Raz A. (2011). La biodiversidad en México: su conservación y las colecciones biológicas. *Ciencias UNAM*. 101: 36-43. www.revistaciencias.unam.mx/pt/103-revistas/revista-ciencias-101/843-la-biodiversidad-en-mexico-su-conservacion-y-las-colecciones-biologicas.html.
- Pompeu G., Gratão P., Vitorello V., y Azevedo R. (2008). Antioxidant isoenzyme responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture. *Scientia Agricola*. 65: 548-552. DOI: 10.1590/S0103-90162008000500015.
- Potisek M. C. M., y Sarmiento L. N. P. (1996). Germinación de semillas y su establecimiento *in vitro* de *Laelia rubescens* Lindley y *Epidendrum stamfordianum* Batem. Reporte Anual de Ciencia y Tecnología INIFAP. CIR-SURESTE Campeche, Camp., México. 187-192.
- Pupulin F., y Bogarín D. (2004). Two new species of *Lepanthes* (Orchidaceae: *Pleurothallidinae*) from Costa Rica. *Kew Bulletin*. 59: 559-563.
- Quiroz K., Saavedra J., Vogel H., Verdugo G., Caligari P. D. S., y García-González R. (2017). *In vitro* asymbiotic germination for micropropagation of the recalcitrant terrestrial orchid *Chloraea crispa* (Orchidaceae). *Applications in Plant Sciences*. (USA). 5(8): 1-9. <https://doi.org/10.3732/apps.1600142>.
- Rademacher W. (2017). Chemical regulators of gibberellins status and their application in plant production. En: Rademacher W, editor. *Annual Plant Review Online*. Annual Plant Reviews book series. The Gibberellins. Wiley Online Library. 49: 359-403. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0541>.
- Rao A. T. (1998). Conservation of wild orchids of kodagu in the western ghats. Bangalore: The Technology Development and Agricultural Technologies and Services Pvt. Ltd. 242.
- Rodríguez C., Nomberto C., Murga S., y Ilich S. (2012). Efecto del ácido naftalenacético y 6 bencilaminopurina en la germinación y crecimiento de *Lepidium peruvianum* Chacón “maca” *in vitro*. *Revista de Ciencias y Tecnología*. 8(22): 35-46. <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/PGM/article/view/188>.

- Roldán E. R., y Garde J. J. (2014). Biotecnología de la reproducción y conservación de especies en peligro de extinción. 307-334. <https://nodo.ugto.mx/wp-content/uploads/2018/07/Biotecnología-de-la-reproducción-y-conservación-de-especies-en-peligro-de-extinción.pdf>.
- Ruíz B. C., Laguna C. A., Iglesias A. L. G., Damon A., Marín H. T. N., Azpíroz R. H. S., y Moreno M. J. L. (2008). *In vitro* germination of *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr. (Orchidaceae). *Phyton- International Journal of Experimental Botany*. 77: 203-215. www.revistaphyton.fund-romuloraggio.org.ar.
- Rzedowski J. (1998). “Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México”. En: Ramammoorthy, T.P. y col. (comps). *Diversidad Biológica de México, Orígenes y Distribución*. Instituto de Biología, UNAM, México, D.F. 129-145.
- Sagare A. P., Lee Y. L., Lin T. C., Chen C. C., y Tsay H. S. (2000). Cytokinin-induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Corydalis yanhusuo* (Fumariaceae)- a medicinal plant. *Plant Science*. 160:139-147.
- Sagawa Y., y Kunisaki J. T. (1984). Clonal Propagation: Orchids. *Cell Culture and Somatic Cell*. 3: 61-67.
- Sahagún B. (1975). *Historia General de las Cosas de Nueva España*. Editorial Porrúa. México. 508-685. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682016000200197.
- Sahagún B. (2006). *Historia General de las Cosas de Nueva España*. Editorial Porrúa. México. 508-685.
- Salazar-Rojas V. M., Herrera-Cabrera E. B., Flores-Palacios A., y Ocampo-Fletes I. (2007). Traditional use and conservation of the “Calaverita” *Laelia anceps* subs. *dawsonii* f. *chilapensis* Soto-Arenas at Chilapa, Guerrero, México. *Lankesteriana*. 7(1-2): 368-370. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=44339813075>.
- Sánchez R. H., Díaz R. S., y Galeano E. G. (2019). *Manual de prácticas de laboratorio. cultivo de tejidos vegetales in Vitro*. 1era Edición. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Agronomía Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.
- Santos-Hernández L., Martínez-García M., Campos J. E., y Aguirre-León E. (2005). *In vitro* propagación de *Laelia albida* (Orquidáceas) para fines de conservación y

- ornamentales en México. Hort Science. 40(2): 439-442.
DOI:10.21273/HORTSCI.40.2.439.
- Sanz D. (9 de noviembre de 2011). México se queda sin orquídeas. Medio ambientales.
<http://medioambientales.com/mexico-se-queda-sin-orquideas/>.
- Sarabia-Ochoa M. E. (2010). Callus Growth and Plant Regeneration in *Laelia speciosa* (Orchidaceae). Lankesteriana International Journal on Orchidology. 10(1): 13-18.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=44340042002>
- Sarwar M., y Skirvin R. M. (1997). Effect of Thidiazuron and 6- benzylaminopurine on adventitious shoot regeneration from leaves of three strains of ‘Melntosh’ apple (*Malus X domestica* Borkh) *in vitro*. Scientia Horticulturae. 68(1-4): 95-100.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304423896009715>.
- Schiller L., y Magnitskiy S. (2019). Effect of trans-zeatin riboside application on growth of banana (*Musa* AAA Simmonds) cv. Williams in the juvenile phase. Ciencias Hortícolas. 13(2): 161-70.
https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencias_horticolos/article/view/8987.
- Secretaría del Medio Ambiente. (2010). Las Orquídeas del Estado de México. Gobierno del Estado de México Toluca de Lerdo, Estado de México. 240.
- SEMARNAT-2010-NOM-059. (2010). NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2018, Protección ambiental Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario oficial.
- Shakirova F. M., Sakhabutdinova A. R., Bezrukova M. V., Fatkhutdinova R. A., y 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).
- Sheehan T. J. (1983). Recent advances in botany, propagation, and physiology of orchids. Horticulturae reviews. 5: 279-315. <https://doi.org/10.1002/9781118060728.ch6>.
- Shimura H., y Koda Y. (2004). Micropropagation of *Cyproedium macranthos* var. rebunense through protocorms-like bodies derived from mature seeds. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 78: 273-276.
<https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000025641.49000.b5>.

- Simeón R. (2004). Diccionario de la lengua náhuatl o mexicana. México, Siglo XXI. 4.
- Smith R. (2012). Cultivo de tejidos vegetales: técnicas y experimentos. Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments. USA 3rd edition.
- Sondahl M., Nakamura T., y Sharp W. (1991). Propagación *in vitro* del café. En: Roca, W. y *Mooginski Li* (eds). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. 621-642.
- Soto M. A. (1996). México (cuenta regional). En Orquídeas: estudio del estado y plan de acción de conservación. Grupo de Especialistas en Orquídeas de la UICN/SSC. 53-58.
- Soto M. A., Solano G. R., y Hágsater E. (2007). Risk of extinction and patterns of diversity loss in Mexican orchids. *Lankesteriana International Journal on Orchidology*. 7(1–2): 114-121. <https://DOI:10.15517/lank.v7i1-2.18449>
- 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. 153-160.
- Stevens J., Senaratna T., y 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 Regulation*. 49: 77-83. <https://doi.org/10.1007/s10725-006-0019-1>.
- Suárez-Quijada I., Hernández-Altamirano M., Chávez-Ávila V. M., Sandoval-Zapotitla E., y Martínez-Palacios A. (2007). Propagación *in vitro* y aclimatización de *Euchile mariae* (Ames) Withner (Orchidaceae). *Lankesteriana international journal on orchidology*. 7(1-2): 388-393. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=44339813081>.
- Swarts N. D., y Dixon K. W. (2009). Perspectives on orchid conservation in botanic gardens. *Trends in Plant Science*. 14 (11): 590-598. https://www.researchgate.net/publication/26792566_Perspectives_on_orchid_conservation_in_botanic_gardens.
- Szeszko-Fabila D. R. (2010). La Orquideoflora Mexiquense. México. Gobierno del Estado de México.

- Tabiyeh D., Bernard F., y Shacker H. (2006). Investigation of glutathione, salicylic acid and GA3 effects on browning in pistacia vera shoot tips culture. *Acta Horticulturae*. 726: 201-204. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.726.31>.
- Tang W., y Newton R. (2004). Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Science*. 167(3): 621-628. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.05.024>.
- Thorpe T. A. (2014). History of Plant Tissue Culture. *Methods in Molecular Biology*. 318. *Plant Cell Culture Protocols*, Second Edition Edited by: V. M. Loyola-Vargas and F. Vázquez-Flota. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Tisserat B., y Jones D. (1999). Clonal propagation of Orchids. En: Hall R D (Ed.) *Plant Cell Culture Protocols*. 127-134. CPRO DLO. Wageningen.
- Torres Y. A. D. (2020). Establecimiento de una metodología para la embriogénesis somática de la orquídea *Dracula vampira* [Tesis de pregrado, Universidad Técnica del Norte]. <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/9892>.
- Turner I. M., Tan H. T., Wee Y. C., Ibahim A. B., Chew P. T., y Vliet G. V. (1994). C.I.T.E.S. and orchids-a conflict between conservation an international trade. *UK*. 1: 188-194. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682016000200197.
- Turrens J. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*. 552(Pt2): 335-344. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>.
- Valderrama A. S., Tejada-Castillo P., Sánchez M. R., Parimango-Quispe C., Santa María-Reyes A., Vega-Huamán A., y Chico-Ruiz J. (2009). Desarrollo *in vitro* de plántulas de *Epidendrum* sp. (Orchidaceae) utilizando carbón activado y 6-bencil-amino purina (BAP), REBIOL (Perú). 29(1): 1-5.
- Van S. J., Fennell C. W. y Taylor N. J. (2006). Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. *Acta Horticulturae*. 725: 55-62. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.725.2>.
- Villanueva C. E., Arellano C., Sánchez O., y Flores C. R. (2013). Adaptación, micropropagación y conservación de orquídeas (*Cattleya* sp.) nativas de clima tropical húmedo lluvioso. *Centro de Biotecnología (Perú)*. 2(1): 52-59.

https://vdocuments.mx/adaptacion-micropropagacion-y-conservacion-de-aclimatacion-de-las-orquideas.html?page=1#google_vignette.

- Wang S. Y., Faust M., y Line M. J. (1994). Apical dominance in apple (*Malus domestica* Borkh): The possible role of Indole-3- Acetic Acid (IAA). *Journal of the America Society for Horticultural Science*. 119(6): 1215-1221. <https://doi.org/10.21273/JASHS.119.6.1215>.
- Wayne W. D. (2013). *Bioestadística: Una base para el análisis en las ciencias de la salud*. 8ª Edición, John Wiley and Sons, Nueva York. <https://idoc.pub/documents/daniels-capitulo-1-bioestadistica-base-para-el-analisis-de-las-ciencias-de-la-salud-daniel-wayne-w-k6nq6e8rqzlw>.
- Xie Z. J., Jiang D., Dai T. B., Jing Q., y Cao W. X. (2004). Effect of exogenous ABA and cytokinin on leaf photosynthesis and grain protein accumulation in wheat ears cultured *in vitro*. *Plant Growth Regulation*. 44: 25-32. <https://doi.org/10.1007/s10725-004-1880-4>.
- Zavaleta-Mancera H. A., López-Delgado H., Loza-Tavera H., Mora-Herrera M. E., Trevilla-García C., Vargas-Suárez M., Ougham H. (2007). Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. *Journal of Plant Physiology*. 164: 1572-1582. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.02.003>.
- Zeng S., Huang W., Wu K., Zhang J., Da Silva-Teixeira J.A. y Duan J. (2016). Propagación *in vitro* de orquídeas *Paphiopedilum*. *Reseñas Críticas en Biotecnología*. 36(3): 521-534. <http://doi.org/10.3109/07388551.2014.993585>.
- Zeng S., Zhang Y., Da Silva T. J. A., Wu K., Zhang J., y Duan J. (2014). Biología de semillas y germinación *in vitro* de semillas de *Cypripedium*. *Reseñas críticas en Biotecnología*. 34(4): 358-371. <http://doi.org/10.3109/07388551.2013.841117>.

GLOSARIO

Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) Auxina más utilizada para la inducción de embriogénesis somática.

Ácido naftalenacético (ANA) Auxina sintética, se utiliza ampliamente en horticultura para estimular la formación de raíces adventicias.

Ácido salicílico Compuesto fenólico y constituyente natural de las plantas, el AS debe incluirse en la categoría de fitohormonas, la cual involucrada en la inducción de respuestas ante estrés biótico y abiótico.

Bencil Amino Purina (BAP) Fitohormona compuesto natural o de síntesis que participa y promueve la división de las células vegetales.

Biodiversidad Variedad de la vida e incluye varios niveles de la organización biológica. Abarca a la diversidad de especies de plantas, animales, hongos y microorganismos que viven en un espacio determinado, a su variabilidad genética, los procesos ecológicos y evolutivos que se dan a nivel de ecosistemas y paisajes.

Brotos de *novo* Formación de nuevos órganos de manera directa sin la formación de callo. Si la formación es de brotes, raíces o flores se denominan organogénesis directa.

Callo Células de tejido no estructuradas, llamadas parénquima, que se derivan de la materia vegetal utilizada en experimentos e investigaciones.

Callo friable Tipo de callo que se caracteriza por ser suave, húmedo y fácil de desmenuzarse, mientras que el callo no friable es más duro y seco.

Callo no friable Masa de células no diferenciadas que se forma en las plantas

Cultivo *in vitro* Como técnica, consiste esencialmente en aislar una porción de la planta, llamada explante, y suministrarle artificialmente las condiciones apropiadas para que las células allí contenidas expresen su potencial intrínseco o inducido.

Desdiferenciación Proceso donde las células maduras pierden sus características específicas y vuelven a un estado de célula madre.

Embriogénesis Somática puede definirse, como el proceso a través del cual, las células somáticas se pueden diferenciar en embriones somáticos

Endemismo En biología, se refiere a un ser vivo que habita exclusivamente en un área geográfica definida de forma natural.

Epífita adj. Bot. Dicho de un vegetal Que vive sobre otra planta, sin alimentarse a expensas de esta; p. ej., los musgos y líquenes.

Especies reactivas de oxígeno (EROs) Especialmente el H₂O₂, sirven como moléculas mensajeras por medio de la modificación oxidativa de proteínas de señalización.

Explante Tejido vivo separado de su órgano propio y transferido a un medio artificial de crecimiento.

Morfogénesis Formación o la génesis de órganos y comprende el crecimiento y la diferenciación celular.

Organogénesis Es una de las vías morfogenéticas en la cual se diferencian meristemos a partir de las células o tejidos cultivados.

Raíces adventicias Raíces que se producen a partir de yemas ubicadas en los tallos de la planta y que no provienen de la raíz original del embrión.

Regreening Volver a verde.

Senescencia Proceso de envejecimiento biológico que experimentan las plantas y sus órganos vegetativos, como hojas.

Somático Se refiere a la diferenciación de varios sistemas de órganos y el desarrollo de una planta.

Thidiazuron (TDZ) Fitohormona o producto químico con alta actividad como citoquinina.

Totipotencia Potencia celular máxima, que le confiere a la célula la capacidad de dirigir el desarrollo total de un organismo.

Velamen Tejido que cubre las raíces aéreas de las orquídeas epifíticas, encargado de absorber agua y de evitar la evaporación excesiva de agua desde el tejido radical.

Yemas Estructuras pequeñas de las plantas ubicadas en los nudos de los tallos y en el extremo terminal de los tallos, encargadas de producir nuevas ramas o flores.