



Universidad Autónoma del Estado de México

Centro Universitario UAEM Tenancingo



“EFECTO DEL ÁCIDO SALICÍLICO EN EL DESARROLLO Y LA
ACLIMATACIÓN DE MICROPLANTAS DE *Guarianthe aurantiaca* Y *Laelia
anceps*”

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO EN FLORICULTURA

PRESENTA:

Annet Michel Cruz Sosa

DIRECTORAS:

Dra. Martha Elena Mora Herrera

M. en C. Diana Yatzil Reyes Araujo

Tenancingo, Estado de México, mayo 2025.

RESUMEN

La micropropagación es considerada como una técnica biotecnológica que permite obtener plantas en poco tiempo y espacio, en donde uno de los principales desafíos es la aclimatación a condiciones *ex vitro*. Además, el crecimiento de algunas orquídeas en condiciones *in vitro* es muy lento, por lo que el uso de moléculas como el ácido salicílico (AS), que tiene funciones en la regulación del crecimiento, desarrollo, maduración y en respuestas de defensa, además de inducir tolerancia al estrés biótico y abiótico, podría fortalecer el desarrollo de microplantas y ayudar en el proceso de aclimatación para ser transferidas a condiciones *ex vitro*. No obstante, la respuesta al AS varía según la especie, variedad, genotipo, concentración, forma y momento de aplicación. Por lo que el propósito de este trabajo fue evaluar el efecto del ácido salicílico en el desarrollo y la supervivencia *ex vitro* de microplantas de *Guarianthe aurantiaca* y *Laelia anceps*. Para ello, se cultivaron microplantas de *Laelia anceps* y *Guarianthe aurantiaca* en medio MS al 100 % con 0, 10, 50 y 100 de AS μM durante 3 meses. Posteriormente, se evaluó la supervivencia *in vitro*, longitud de raíces y de hojas, el número de hojas y raíces, peso fresco y la supervivencia *ex vitro*. Se observó que el crecimiento *in vitro* de *G. aurantiaca* fue muy lento en todos los tratamientos con AS, incluido el testigo. Algunas presentaron oxidación y no hubo diferencias significativas en ninguna de las variables. Caso contrario en *L. anceps*, donde si hubo diferencias significativas en las variables evaluadas de longitud de raíces y de hojas, número de hojas y peso fresco. Además, los tratamientos 10 y 100 μM de AS incrementaron la supervivencia de las microplantas en condiciones *ex vitro*. Estos resultados evidencian la diversidad de respuestas fisiológicas a compuestos como el AS entre especies inclusive de la misma familia y resaltan la importancia de continuar investigando protocolos para la inducción de tolerancia al estrés.

ABSTRACT

Micropropagation is considered a biotechnological technique that enables the production of plants in a short time and using limited space, where one of the main challenges is acclimatization to *ex vitro* conditions. Moreover, the growth of some orchids under *in vitro* conditions is very slow, which is why the use of molecules such as salicylic acid (SA) which plays roles in regulating growth, development, maturation, and defense responses, as well as inducing tolerance to biotic and abiotic stress could enhance the development of microplants and assist in the acclimatization process for transfer to *ex vitro* conditions. However, the response to SA varies depending on the species, variety, genotype, concentration, form, and timing of application. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of salicylic acid on the development and *ex vitro* survival of microplants of *Guarianthe aurantiaca* and *Laelia anceps*. To this end, microplants of *Laelia anceps* and *Guarianthe aurantiaca* were cultured on 100% MS medium with 0, 10, 50, and 100 μM of SA for 3 months. Subsequently, *in vitro* survival, root and leaf length, number of leaves and roots, fresh weight, and *ex vitro* survival were evaluated. It was observed that the *in vitro* growth of *G. aurantiaca* was very slow across all SA treatments, including the control. Some showed oxidation, and there were no significant differences in any of the variables. In contrast, in *L. anceps*, there were significant differences in the evaluated variables: root and leaf length, number of leaves, and fresh weight. Furthermore, the 10 and 100 μM SA treatments increased the survival of microplants under *ex vitro* conditions. These results highlight the diversity of physiological responses to compounds such as SA among species, even within the same family, and underscore the importance of continuing to investigate protocols for inducing stress tolerance.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. ANTECEDENTES.....	10
2.1 Biodiversidad.....	10
2.2 Orquídeas.....	12
2.3 Importancia de las orquídeas.....	16
2.4 Problemáticas de las orquídeas.....	17
2.5 Alternativas de conservación de orquídeas.....	18
2.6 Ácido salicílico.....	23
3. JUSTIFICACIÓN.....	24
4. HIPÓTESIS.....	27
5. OBJETIVOS.....	27
5.1 General.....	27
5.2 Específicos.....	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
6.1 Sitio experimental.....	28
6.2 Material biológico.....	28
6.3 Condiciones de cultivo <i>in vitro</i>	29
a) Medio de cultivo de propagación.....	29
b) Medio de cultivo con AS.....	30
6.4 Condiciones de cultivo <i>ex vitro</i>	31
6.5 Descripción de los experimentos en cultivo <i>in vitro</i>	32
6.5.3. Variables evaluadas.....	34
6.5.4. Diseño experimental.....	35
6.6 Descripción de los experimentos en aclimatación <i>ex vitro</i>	35
6.5.1 Variables evaluadas.....	37
6.5.2 Diseño experimental.....	38
8. DISCUSIÓN.....	46
9. CONCLUSIONES.....	49
10. PERSPECTIVAS.....	49
11. BIBLIOGRAFÍA.....	50
12. ANEXOS.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imágenes de la morfología de <i>L. anceps</i> que representa A) Hábito de crecimiento epífito, B) Flor con labelo, C) Pseudobulbos y hojas D) y E) Inflorescencia y flores. Fotos tomadas de iNaturalist Mexico. https://www.inaturalist.org/taxa/204984-Laelia-anceps/browse_photos . Con modificaciones.....	14
Figura 2. Imágenes de la morfología de <i>G. arauntiacae</i> que se representa A), B) y C) Hábito de crecimiento epífito, D) Inflorescencia, E) y F) Flores y G) Hoja y cápsula inmadura. Fotos tomadas de iNaturalist Mexico, https://mexico.inaturalist.org/taxa/284255-Guarianthe-aurantiacae/browse_photos . Con modificaciones.....	16
Figura 3. Vitroplantas de <i>G. arauntiacae</i> cultivadas por 18 meses en medio Murashige y Skoog.....	28
Figura 4. Vitroplantas de <i>L. anceps</i> desarrolladas por 6 meses en medio Murashige y Skoog.....	28
Figura 5. Concentraciones de AS para los medios de cultivo en cada tratamiento, a) solución concentrada 20 mg en 100 mL de AS para el tratamiento 2 (10 μ M) y 3 (50 μ M), b) peso directo en miligramos de AS para el tratamiento 4 (100 μ M).....	31
Figura 6. Domo acondicionado utilizados en la aclimatación de vitroplantas de <i>G. arauntiacae</i> y <i>L. anceps</i>	32
Figura 7. Sustratos utilizados en la aclimatación ex vitro de <i>G. arauntiacae</i> y <i>L. anceps</i> : a) carbón vegetal, b) perlita, c) corteza de pino y d) peat moss.	32
Figura 8. Diagrama de la descripción del experimento y desarrollo <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i> de microplantas de <i>G. aurantiaca</i> precultivadas en ácido salicílico.	33
Figura 9. Diagrama de la descripción del experimento y desarrollo <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i> de microplantas de <i>L. anceps</i> precultivadas en ácido salicílico.	34
Figura 10. Diagrama del desarrollo <i>ex vitro</i> de microplantas de <i>G. aurantiaca</i> y <i>L. anceps</i> precultivadas en ácido salicílico.	37
Figura 11. Longitud de raíces de microplantas de <i>G. arauntiacae</i> precultivadas 3 meses en AS. Los resultados son el promedio de 10 repeticiones por tratamiento, \pm e.s. Las barras con la misma letra son estadísticamente iguales. Diferencia estadística (Tukey , $p < 0.05$).....	40
Figura 12. Longitud de hojas de microplantas de <i>G. arauntiacae</i> precultivadas 3 meses en AS. Los resultados son el promedio de 10 repeticiones por tratamiento, \pm e.s. Las	

barras con la misma letra son estadísticamente iguales. Diferencia estadística (Tukey , $p < 0.05$).....	40
Figura 13. Número de raíces de microplantas de <i>G. arauntiac</i> a precultivadas 3 meses en AS. Los resultados son el promedio de 10 repeticiones por tratamiento, \pm e.s. Las barras con la misma letra son estadísticamente iguales. Diferencia estadística (Tukey , $p < 0.05$).	41
Figura 14. Número de hojas de microplantas de <i>G. arauntiac</i> a precultivadas 3 meses en AS. Los resultados son el promedio de 10 repeticiones por tratamiento, \pm e.s. Las barras con la misma letra son estadísticamente iguales. Diferencia estadística (Tukey , $p < 0.05$).	41
Figura 15. Peso fresco de microplantas de <i>G. arauntiac</i> a precultivadas 3 meses en AS. Los resultados son el promedio de 10 repeticiones por tratamiento, \pm e.s. Las barras con la misma letra son estadísticamente iguales. Diferencia estadística (Tukey , $p < 0.05$). 42	
Figura 16. Vitroplantas de <i>G. arauntiac</i> a precultivadas en AS durante 3 meses. ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 17. Longitud de raíces de microplantas de <i>L. anceps</i> precultivadas 3 meses en AS. Los resultados son el promedio de 20 repeticiones por tratamiento, \pm e.s. Las barras con la misma letra son estadísticamente iguales. Diferencia estadística (Tukey , $p < 0.05$).	43
Figura 18. Longitud de hojas de microplantas de <i>L. anceps</i> precultivadas 3 meses en AS. Los resultados son el promedio de 20 repeticiones por tratamiento, \pm e.s. Las barras con la misma letra son estadísticamente iguales. Diferencia estadística (Tukey , $p < 0.05$). 43	
Figura 19. Número de raíces de microplantas de <i>L. anceps</i> precultivadas 3 meses en AS. Los resultados son el promedio de 20 repeticiones por tratamiento, \pm e.s. Las barras con la misma letra son estadísticamente iguales Diferencia estadística (Tukey , $p < 0.05$). 44	
Figura 20. Número de hojas de microplantas de <i>L. anceps</i> precultivadas 3 meses en AS. Los resultados son el promedio de 20 repeticiones por tratamiento, \pm e.s. Las barras con la misma letra son estadísticamente iguales. Diferencia estadística (Tukey , $p < 0.05$). 44	
Figura 21. Peso fresco de microplantas de <i>L. anceps</i> precultivadas 3 meses en AS. Los resultados son el promedio de 20 repeticiones por tratamiento, \pm e.s. Las barras con la misma letra son estadísticamente iguales. Diferencia estadística (Tukey , $p < 0.05$). ... 45	
Figura 22. Vitroplantas de <i>L. anceps</i> precultivadas en AS durante 3 meses.....	42
Figura 23. Almácigo con vitroplantas de <i>G. arauntiac</i> a en aclimatación <i>ex vitro</i> ¡Error! Marcador no definido.	

Figura 24. Vitroplantas de *G. arauntiacae* después de la aclimatación *ex vitro*....**¡Error!**

Marcador no definido.

Figura 25. Almacigo con vitroplantas de *L. anceps* en aclimatación *ex vitro*.....**¡Error!**

Marcador no definido.

Figura 26. Vitroplantas de *G. arauntiacae* después de la aclimatación *ex vitro*....**¡Error!**

Marcador no definido.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Biodiversidad de México, de acuerdo con la CONABIO, 2022. 11

Tabla 2. Número de especies de plantas en el mundo y en México de acuerdo con CONABIO (2022). 11

Tabla 3. Composición química y cantidades requeridas para las sales del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS)..... 29

Tabla 4. Soluciones concentradas para el medio de cultivo (Mora-Herrera, 2007). 30

Tabla 5. Condiciones ambientales en las que se mantuvieron las vitroplantas precultivadas en AS de *Guarianthe arauntiacae* y *Laelia anceps* en la aclimatación *ex vitro*..... 36

Tabla 6. Supervivencia de microplantas de *G. arauntiacae* precultivadas en AS durante 3 meses. 39

Tabla 7. Porcentaje de supervivencia de microplantas de *L. anceps* precultivadas en AS durante 3 meses. 42

Tabla 8. Supervivencia *ex vitro* de microplantas de *G. arauntiacae* precultivadas en AS durante 3 meses. 45

Tabla 9. Supervivencia *ex vitro* de microplantas de *L. anceps* precultivadas en AS durante 3 meses. 46

ABREVIATURAS

μM: Micromolar.

AMO: la Asociación Mexicana de Orquideología.

ANP: Áreas Naturales Protegidas.

AS: Ácido salicílico

CMVC: Centro Mundial de Vigilancia de la Conservación.

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

CONANP: Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas.

CTV: Cultivo de Tejidos Vegetales.

fM: Fentomolar.

MS: Medio de cultivo Murashige y Skoog.

pM: Picomolar.

PNUD: Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo.

PNUMA: Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente.

PROFEPA: Procuraduría Federal de Protección al Ambiente.

SEMARNAT: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

UMA: Unidades de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre.

1. INTRODUCCIÓN

México se ubica en el quinto lugar dentro de los 17 “países megadiversos” del mundo (Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas [CONANP], 2018). En cuanto a la flora, está entre los cinco países con mayor número de especies de plantas vasculares. Hasta la fecha se han registrado más de 25 mil especies de las cuales la mayoría son angiospermas (23,791) (SEMARNAT, 2012). Además, muchas de ellas son de origen y domesticación mexicana (Plascencia *et al.*, 2011).

Una de las familias más importantes son las orquídeas, que constituyen uno de los grupos de plantas más diversos en el mundo, con alrededor de 20 a 30 mil especies. En México se han registrado alrededor de 1260 especies y 170 géneros; es decir, el 40 % de las orquídeas mexicanas son endémicas (PROFEPA, 2022; Sarukhán *et al.*, 2017).

Los estados con mayor riqueza de orquídeas son Michoacán, Guerrero, Chiapas, Veracruz y Oaxaca (Tejeda-Sartorius, 2018). Debido a la gran diversidad morfológica, larga duración de las flores, aroma y apariencia de las orquídeas, su comercialización se ha expandido notablemente en las últimas décadas (Chavez-Cruz *et al.*, 2022; De Menezes *et al.*, 2016). En consecuencia, es uno de los grupos más vulnerables, ya que los hábitats van desapareciendo a ritmos acelerados por la sobreexplotación en el medio silvestre, comercio ilegal, deforestación, cambio de uso de suelo para actividades agropecuarias, el avance urbano y el cambio climático (Nájar, 2011); por estas razones, se deben tomar medidas urgentes para reducir la pérdida de hábitats naturales y por siguiente la biodiversidad (UNDP, 2015).

Una alternativa para contrarrestar esta problemática es el uso de la biotecnología a través del cultivo *in vitro* para incrementar la producción de orquídeas, ya sea para fines comerciales o para programas de conservación (Thammasiri *et al.*, 2022). En las fases de la propagación *in vitro* de orquídeas una de las etapas más críticas es la aclimatación, donde disminuye la supervivencia (Chandra *et al.*, 2010), ya que las plantas micropropagadas tienen la necesidad de adaptarse para sobrevivir a cambios severos de humedad, irradiancia, temperatura, patógenos y medio de crecimiento (Lando *et al.*, 2016). Algunas investigaciones han demostrado que el ácido salicílico (AS) podría coadyuvar a esta adaptación por ser una molécula que participa en procesos fisiológicos importantes y que tiene funciones en la regulación de crecimiento, desarrollo, maduración

y respuestas de defensa de las plantas, además de inducir tolerancia al estrés biótico y abiótico (Miura y Tada, 2014).

2. ANTECEDENTES

2.1 Biodiversidad

La biodiversidad, también conocida como diversidad biológica, se refiere a la gran variedad de organismos vivos que habitan en un espacio determinado del planeta Tierra tras miles de millones de años de evolución. Abarca diferentes grados de organización biológica: plantas, animales, insectos, hongos, peces y microorganismos; asimismo, incluye procesos evolutivos y ecológicos que ocurren en el ámbito de los genes, especies y paisajes. Las especies domesticadas por el ser humano, como maíces, frijoles, calabazas, chiles, caballos, vacas y borregos, también forman parte de la biodiversidad (CONABIO, 2022; Crespo, 2022).

La biodiversidad asegura el equilibrio de los ecosistemas a nivel global, por lo que la especie humana depende de ella para subsistir. Por un lado, es el fruto de millones de años de la naturaleza, que genera variados climas y recursos como los diferentes nichos ecológicos que permiten la existencia de numerosas especies, lo que hace que su valor sea incalculable e irremplazable. Además, provee bienes y servicios tan vitales para la vida del ser humano como la comida, el aire, el agua, la energía y el oxígeno. También suministra materias primas que promueven el crecimiento económico, es la fuente de medicamentos y brinda hermosos paisajes que podemos apreciar (Sarandón, 2020).

2.1.1 Países megadiversos

El Centro Mundial de Vigilancia de la Conservación (CMVC), perteneciente al Programa de Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente (PNUMA), considera países megadiversos aquellos que albergan al menos 5,000 plantas endémicas y que poseen ecosistemas marinos dentro de sus fronteras. Esta categoría se ha otorgado a 17 países, entre los que destacan: Australia, Brasil, China, Colombia, Ecuador, Estados Unidos, Filipinas, India, Indonesia, Madagascar, Malasia, México, Papúa Nueva Guinea, Perú y la República Dominicana del Congo hasta Sudáfrica y Venezuela. Cada uno de estos países contribuye de manera única a la gran diversidad biológica de nuestro planeta (Ratia, 2024).

2.1.2 Biodiversidad en México

México se encuentra en el quinto lugar de los países más megadiversos del planeta, después de Brasil, Colombia, China e Indonesia y tercer lugar en América. Su compleja fisiografía e historia geológica y climática han creado una variada gama de condiciones

que hacen posible la coexistencia de diversas especies de origen tropical y boreal, que al paso del tiempo también han permitido una intensa diversificación de muchos grupos taxonómicos (Espinosa *et al.*, 2008).

A pesar de representar tan solo el 1.5 % de la superficie terrestre del planeta, se estima que en México habitan entre el 10 y el 15 % de las especies del mundo, sin olvidar que las especies endémicas representan alrededor del 50 y 60 % (Sarukhán, 2009; SEMARNAT, 2012). Además, México ocupa el segundo lugar mundial en cuanto al número de especies de reptiles (864), el tercer lugar en mamíferos (564), el quinto lugar en anfibios (376) y plantas vasculares (21,989-23,414), el undécimo en aves (1,123-1,150) (Tabla 1) (CONABIO, 2022).

Tabla 1. Biodiversidad de México, de acuerdo con la CONABIO, (2022).

	Plantas vasculares	Mamíferos	Aves	Reptiles	Anfibios
Posición mundial	5	3	11	2	5
Número de especies	21,989-23,414	564	1,123-1,150	864	376

2.2.3 Biodiversidad de plantas en México

De acuerdo con Villaseñor *et al.* (2023), las plantas se dividen en dos grupos: las que tienen un sistema vascular por el cual circula o se transporta la savia y los nutrientes y las no vasculares que absorben el agua y los nutrientes directamente en sus células. Las especies de plantas vasculares en México con mayor importancia son: las magnolias y margaritas; después están las palmeras y pastos; cícadasy pinos; helechos; musgos y hepáticas y algas (Tabla 2).

Tabla 2. Número de especies de plantas descritas en el mundo y en México de acuerdo con CONABIO (2022).

Plantas	Especies en el mundo	Especies en México
Magnolias y margaritas	199, 350	19,065
Palmeras y pastos	59, 300	4, 726
Cícadasy pinos	980	150
Helechos	13, 025	1, 067
Musgos y hepáticas	19, 900	1, 482

Algas	27,000	2,702
Total de especies descritas	319, 555	29, 192

Entre una de las familias más importantes y numerosas de las angiospermas, división Magnoliophyta (plantas con flores) están las orquídeas con alrededor de 25,000 especies. Actualmente formada por 6 subfamilias: Apostasioideae, Cyripedioideae, Epidendroideae, Orchidoideae, Vandoideae, Vanilloideae, de las cuales la mayoría están presentes en México.

2.2 Orquídeas

México pertenece a los países con biomasas que poseen condiciones propicias para el desarrollo de las orquídeas (Sánchez *et al.*, 2019). Se han registrado alrededor de 1,260 especies y 170 géneros, de las cuales el 40 % de especies y 8 % de géneros de las orquídeas mexicanas son endémicas (PROFEPA, 2022; Sarukhán *et al.*, 2017). Los estados con mayor riqueza son: Michoacán, Guerrero, Chiapas, Veracruz y Oaxaca (aunque todos los estados cuentan por lo menos con una especie; PROFEPA, 2020). Entre los géneros más importantes y representativos están: *Cattleya*, *Laelia*, *Epidendrum*, *Prostechea*, *Encyclia*, *Oncidium*, *Vainilla*, *Brassia*, *Sobralia*, *Stanhopea*, *Odontoglossum*, *Lemboglossum*, *Maxillaria*, *Gongora*, *Lycaste* y *Rhynchostele* (Gámez *et al.*, 2017; Velázquez-Juárez *et al.*, 2023).

El Estado de México es el hábitat de 202 especies de orquídeas (15 están bajo alguno de los estatus de la NOM-059-Semarnat-2010 y 13 son endémicas), ocupando el tercer lugar a nivel nacional en diversidad de especies (Flores y Sánchez, 2018). En la región sur del estado se han registrado 111 especies de orquídeas; las zonas de Temascaltepec y Ocuilán son las áreas que tienen mayor riqueza en toda la entidad. Por otro lado, la Asociación Mexicana de Orquideología (AMO), el herbario de la Universidad Autónoma de México (MEXU) y el herbario de la Universidad Metropolitana (UAMIZ), reportan 78 especies para el municipio de Temascaltepec, 26 para Tenancingo y 5 para Villa Guerrero (Ceballos-Vásquez, 2023).

Entre los géneros más importantes del Estado de México están los géneros de *Laelia* y *Guarianthe*, ambas son epífitas de origen mexicano, se caracterizan por tener flores vistosas y llamativas, lo que hace que sean extraídas de sus hábitats naturales para diferentes fines. Aunque todavía no se encuentren en alguna categoría de riesgo en la NOM-059-SEMARNAT-2010, es importante como medida preventiva establecer

procesos de propagación masiva para contribuir a la disminución de la presión que actualmente sufren sus poblaciones silvestres. Una alternativa para contrarrestar esta problemática es el uso de la biotecnología a través del cultivo *in vitro* para incrementar su producción ya sea con fines comerciales o como parte de programas de conservación (Thammasiri *et al.*, 2022).

2.2.1 Género *Laelia*

Las laelias son orquídeas epífitas silvestres son muy hermosas por la apariencia de sus atractivas flores. Han sido cultivadas y apreciadas por la gente de México, particularmente por diversos grupos indígenas. Por lo regular, habitan en árboles del género *Quercus* (encinos), pueden adaptarse con facilidad a diferentes ambientes, desde los climas secos hasta las montañas frescas, húmedas y de niebla. La mayoría de las especies 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, Oaxaca, y probablemente en Guerrero y Jalisco (Vera y Llarena, 2021).

Por generaciones, los grupos indígenas desde Chihuahua hasta Chiapas han utilizado el género *Laelia* para elaborar altares, ofrendas y adornos en diversas ceremonias religiosas. También fueron utilizadas como adhesivo para la elaboración de un mucílago, el cual se extraía de los seudobulbos para elaborar el arte plumario prehispánico y la confección de figuras religiosas (Cox-Tamay, 2014; Solano-Gómez *et al.*, 2010).

En México se han clasificado 12 especies y dos subespecies de este género: *L. albida*, *L. anceps* (*L. anceps* ssp. *anceps*/ *L. anceps* ssp. *dawsonii*), *L. aurea*, *L. autumnalis*, *L. crawshayana*, *L. eyermaniana*, *L. furfuracea*, *L. gouldiana*, *L. rubescens*, *L. speciosa*, *L. superbiens* y *L. halbingeriana* (Vera *et al.*, 2021).

***Laelia anceps* Lindl**

También conocida como “Lirio de los árboles” o “Lirio de todos los santos” es una de las especies más importante desde el punto de vista cultural y económico en México. Hasta ahora se reconocen dos subespecies de *L. anceps* con diferentes áreas de distribución geográfica: *L. anceps* subsp. *anceps* y *L. anceps* subsp. *dawsonii* (Archila *et al.*, 2014).

Distribución: *L. anceps* se distribuye en el occidente del país de México; no obstante, se puede encontrar en la costa del Golfo de México desde Tamaulipas a Veracruz. También se encuentra de forma poco frecuente en Guatemala y Honduras (Vera *et al.*, 2021).

Descripción morfológica

Planta: epífita que puede alcanzar una altura de hasta 60 cm. **Raíces:** redondas blanquecinas de hasta 0.2 cm de diámetro. **Pseudobulbos:** alargados con 4 costillas color verde amarillento. **Tipo de crecimiento:** simpoidal. **Hojas:** 1-2 coriáceas de aproximadamente 20 cm de longitud por pseudobulbo. **Inflorescencia:** durante la floración desarrolla un pedúnculo floral apical de 20 cm de altura donde desarrollan de 2 a 4 flores. **Flores:** color rosa violáceo con labelo de color violeta intenso con un agradable aroma a miel. **Fruto:** cápsula con semillas microscópicas. **Época de floración:** se presenta en otoño, principalmente durante el mes de noviembre (Fig. 1) (De la Cruz, 2025; Rocha, 2023; Telléz-Velasco, 2011).

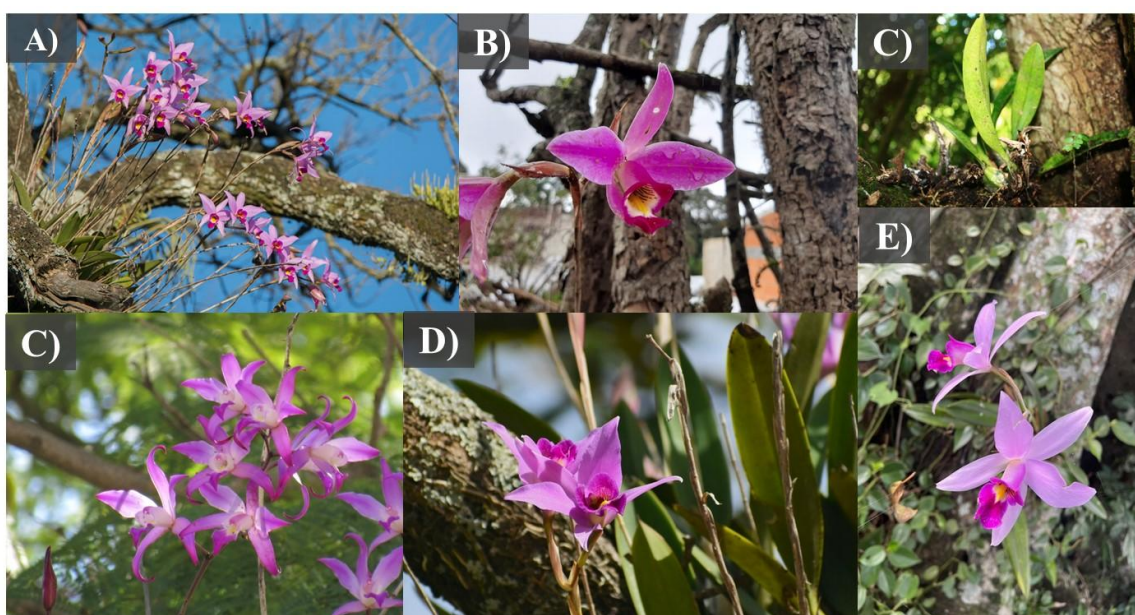


Figura 1. Morfología de *L. anceps* que representa A) hábito de crecimiento epífita, B) flor con labelo, C) pseudobulbos y hojas, D y E) inflorescencia y flores. Fuente: iNaturalist México, con modificaciones.

Debido a la belleza ornamental de las flores de esta especie es la más utilizada para la generación de híbridos, por lo que, aunque aún no se encuentra en peligro de extinción, sus variantes están desapareciendo de los bosques debido a la fuerte presión de extracción por ser una especie utilizada en ceremonias y rituales religiosos (Vera *et al.*, 2021; Tejeda-Sartorius, 2017).

2.2.2 Género *Guarianthe*

Las especies del género *Guarianthe* son plantas epífitas, que se desarrollan en las selvas húmedas de Centroamérica y en el norte de Suramérica. Este género se ha caracterizado

por ser utilizada para generar nuevos híbridos e introducir combinaciones novedosas tal es el caso de *Guarianthe* × *guatemalensis* (Rocha, 2016).

Anteriormente, las especies de *Guarianthe* estaban incluidas en el género *Cattleya* del que se separaron basándose en estudios filogenéticos según datos de la secuencia de ADN; por lo que en 2003 Dressler y Higgins propusieron el nuevo nombre basado en “Guaria” (nombre común de la anteriormente llamada *Cattleya skinneri*), y la palabra en griego “anthos” que quiere decir flor; por lo tanto, *Guarianthe* significa las flores de Guaria.

***Guarianthe arauntiac* (Bateman) Dressler & W.E Higgins**

También conocida como “Lirio” o “Miguelitos”, es una de las especies silvestres más cosechadas de sus hábitats naturales y vendidos como ornamentales en México. Es el único ejemplar cuyas flores son de colores cálidos desde amarillo, naranja o rojizo, característica que es vista para generar nuevos híbridos. Su distribución en México va desde Chiapas, Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa y Veracruz. También se encuentran en países como Guatemala, Honduras, Nicaragua, Salvador y Costa Rica a altitudes que van de 300 a 1600 metros en bosques tropicales y de montaña baja sobre rocas expuestas o en árboles en áreas de calor y frío extremos (Salmerón, 2025).

Descripción morfológica

Planta: epífita u ocasionalmente litófita, de 30-55 cm de alto. **Raíces:** redondas blanquecinas de 0.2-0.3 cm de grosor. **Pseudobulbos:** alargados, ligeramente comprimidos, cuando jóvenes cubiertos por vainas papiráceas, tubulares, apesadas. **Crecimiento:** simpoidal. **Hojas:** 2 subopuestas en el ápice del pseudobulbo, recurvadas, coriáceas, carnosas, elípticas. **Inflorescencia:** terminal de 10-16 cm de largo con hasta 15 flores de color naranja (en ocasiones amarillas o rojizas) y labelo con rayas o marcas de color marrón. **Época de floración:** desde fines del invierno hasta la primavera (Fig. 2) (Domínguez, 2013).

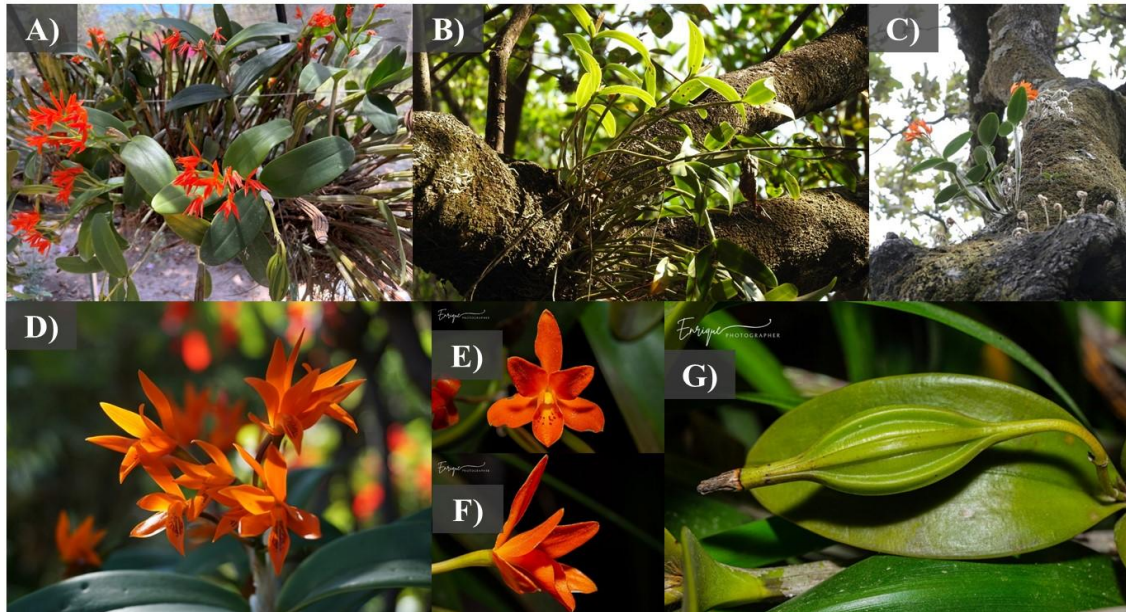


Figura 2. Morfología de *G. arauntiacca* que se representa A, B y C) hábito de crecimiento epífita, D) inflorescencia, E y F) flores y G) hoja y cápsula inmadura. Fuente: iNaturalist Mexico, con modificaciones.

2.3 Importancia de las orquídeas

Sociales

En todas las culturas de México, las orquídeas es uno de los grupos de plantas más admiradas, con un elevado valor cultural; han sido utilizadas desde tiempos milenarios por varios grupos mesoamericanos para satisfacer necesidades sociales de importancia ceremonial, alimenticia (SADER, 2016) y medicinal ya que poseen gran cantidad de sustancias importantes tales como: flavonoides, triterpenos y saponinas (Mencias-Méndez y Salazar-Ponce, 2018). Por ejemplo, *Arpophyllum spicatum* es utilizada para curar o atenuar la disentería y *Encyclia citrina* para curar heridas infectadas. Son utilizadas como adornos en festividades religiosas, constituyendo un elemento muy importante de uso, ya que su floración anual coincide con fechas importantes en las comunidades; por ejemplo, *L. gouldiana* o “monjita” es apreciada por los campesinos locales quienes la utilizan para adornar altares en las festividades del día de muertos (Telléz-Velasco, 2011).

Económicas

La comercialización de orquídeas silvestres es una actividad económica importante a nivel mundial; siendo sus especies las más buscadas por los consumidores, debido a la longevidad de sus flores y su simbolismo particular y sofisticado. En México representa

una alternativa de ingresos económicos para diversas poblaciones (Seidel-Júnior y Venturieri, 2011).

Por ejemplo, en el Sur del Estado de México, el municipio de Tenancingo es punto estratégico para la comercialización de algunas especies de orquídeas principalmente en el periodo otoñal, entre las que se encuentran *L. autumnalis* (La Llave & Lex.) Lindl., *Trichocentrum pachyphyllum* (Hook.) R. Jiménez & Carnevali, *Prosthechea squalida* (La llave & Lex.), *P. karwinskii* Mart., *Oncidium unguiculatum* Lindl. y *Stanhopea hernandezii* Bateman ex Lindl. (Emeterio-Lara *et al.*, 2016).

Ambientales

En México, la mayor diversidad de orquídeas se encuentra en tres tipos de vegetación: bosque tropical perennifolio, bosques templados de encino y bosques mesófilos de montaña (Hágsater *et al.*, 2005). Son consideradas como recursos forestales no maderables que presentan gran importancia ecológica dado que juegan un papel crucial en el ciclo de nutrientes como el carbono, nitrógeno y fósforo; además, proporcionan hogar para especies de animales pequeños, insectos, aves y lagartos (Piña-Torres, 2021). Las flores han desarrollado numerosas estrategias para lograr atraer a los polinizadores (abejas, aves, moscas y polillas), existen especies que aparentan ser alimento y son capaces de imitar a insectos hembra para atraer a los insectos macho como en el caso de la abeja euglossine o abeja de las orquídeas, de un color metálico que va del azul al verde brillante. Lo interesante de esta simbiosis es que solo los machos polinizan a las orquídeas, ya que estas no producen néctar; la recompensa para la abeja son los compuestos aromáticos que atraen a las hembras (Cox-Tamay *et al.*, 2020; Flores y Sánchez, 2018).

2.4 Problemáticas de las orquídeas

A pesar de que de orquídeas son una familia numerosa, presenta grandes problemas que han propiciado que 190 especies se incluyan en alguna categoría de riesgo de la NOM-059-SEMARNAT-2010 (PROFEPA, 2020). La deforestación, el cambio de uso de suelo, la recolección excesiva de ejemplares silvestres para el comercio ilegal, la presión demográfica humana, las carencias en la legislación, la política ambiental y la falta de participación de las comunidades; aunado a que el crecimiento en condiciones naturales es lento, la tasa de germinación de semillas es baja en la naturaleza (1-5 %) debido a la falta de endospermo (Mala *et al.*, 2017; Lee-Espinosa *et al.*, 2010) y además requieren una asociación simbiótica con un hongo específico formador de micorriza para germinar

(Alghamdi, 2019). Todo lo anterior ha dificultado la multiplicación vegetativa y las vuelve vulnerables, ya que poseen ciclos de vida particularmente largos (Maharjan *et al.*, 2020; Murdad *et al.*, 2010).

2.5 Alternativas de conservación de orquídeas

Debido a las problemáticas que actualmente enfrentan las orquídeas es fundamental establecer estrategias que puedan ser implementadas para la producción de orquídeas. Como recurso fitogenético se pueden conservar de manera *in situ* o *ex situ* (Menchaca-García y Salazar-Ponce, 2011).

Conservación *in situ*

La conservación *in situ* se refiere al cuidado de la biodiversidad en su hábitat natural, es la manera más apropiada de conservación de especies, ya que permite proteger las poblaciones de especies de flora y fauna silvestres. Este tipo de conservación requiere de diferentes estrategias que permitan la preservación natural como: las Áreas Naturales Protegidas (ANP) y Unidades de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre (UMA); también están los Predios o Instalaciones que Manejan Vida Silvestre en forma confinada (PIMVS), que a diferencia de las UMA's se limita a la propagación o preservación de ejemplares, comúnmente con fines comerciales tales como jardines botánicos, viveros o invernaderos que manejen orquídeas en algún estatus de riesgo según la NOM-059-SEMARNAT-2010 (Rocha, 2018).

Algunos ejemplos de ANP importantes en México son: el Área de Protección de Flora y Fauna La Primavera ubicada en Jalisco, que abarca los municipios: Tala, Zapopan, El Arenal y Tlajomulco de Zúñiga, donde se encuentra el 80 % de orquídeas del estado de Jalisco (CONAP, 2019); el Parque Nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl (PNIP) en el estado de Jalisco en donde se localizaron y determinaron 39 especies de orquídeas, incluidas en 20 géneros (Luna-Rosales *et al.*, 2007).

Conservación *ex situ*

La conservación *ex situ* es la estrategia de conservación de plantas, genes o genotipos fuera de su ambiente natural para uso actual o futuro. En México una de las actividades que han llevado a que muchas especies se encuentren en alguna categoría de riesgo, es el comercio ilegal; por lo que, la conservación *ex situ* podría ser una alternativa para que los productores puedan comercializar las orquídeas de manera legal (Solano *et al.*, 2007).

Dentro de las herramientas de este tipo de conservación se encuentran los jardines y herbarios botánicos, plantaciones de conservación a partir de semillas o partes vegetativas, colecciones de plantas y los bancos de germoplasma mediante el ADN, polen, yemas o la criopreservación (Pisanty *et al.*, 2016). Un ejemplo en México es la “Asociación Mexicana de Orquideología” (AMO), que se hizo muy reconocida gracias a que muchos recolectores visitaron México, aunado a los esfuerzos realizados por investigadores; esta asociación impulsa a la conservación *ex situ*, ya que cuentan con un Jardín Botánico (Tejeda, 2018).

2.5.1 La biotecnología como alterativa para la conservación de especies vegetales

Otra de las estrategias para contribuir a la conservación y mejoramiento de orquídeas es mediante la investigación científica, incluyendo la biotecnología a través del cultivo *in vitro* (Méndez-Cárdenas *et al.*, 2016).

Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* consiste en tomar desde una célula hasta un órgano completo de una planta madre (ápice, yema, hoja, tallo, meristemo, embrión, semilla, antera, etc.) y en condiciones de asepsia colocarlo en un ambiente artificial y con factores ambientales controlados (temperatura, humedad, nutrientes). Además, permite la clonación, conservación y manipulación de cualquier material vegetal con lo que se logra generar plantas libres de patógenos en corto tiempo, en comparación con una reproducción natural donde los ciclos de reproducción son largos (Esparza, 2020; Utami *et al.*, 2015).

Un ejemplo de importancia para la aplicación del cultivo *in vitro* en orquídeas es en la estimulación de la germinación, ya que al carecer de endospermo en algunos casos tienen que realizar simbiosis con un hongo micorrízico en particular, lo que hace difícil su germinación en condiciones naturales. También se han reportado investigaciones con el objetivo de identificar los requerimientos de fotoperiodo, temperatura y diferentes medios nutritivos para optimizar su desarrollo enfocados en la conservación y producción (Nabieva, 2021; Utami, 2015; Banerjee, 2013).

Micropropagación

Es una técnica de cultivo *in vitro* que utiliza los principios del CTV (cultivo de tejidos vegetales) que permite la producción de plantas genéticamente idénticas, llamadas clones, (Ramírez, 2024). Por este medio se pueden producir un gran número de plantas de alta calidad, libres de enfermedades en un tiempo y espacio relativamente corto, a bajo costo independiente de la estación y el clima (Gupta *et al.*, 2020).

Etapas de la micropropagación

Dentro de la micropropagación se pueden determinar cinco etapas:

Etapas 0: Selección de la planta madre. En algunos casos, la planta madre se prepara y se somete a un proceso de cuarentena bajo condiciones estrictas de sanidad, con el fin de garantizar un crecimiento vegetativo sano y vigoroso (Ramírez, 2024). Esto permitirá obtener cultivos de buena calidad y evitar problemas de contaminación y oxidación en los explantes (Aguilera y Antezana, 2020).

Etapas 1: Establecimiento o inclusión de los cultivos. En esta etapa, es importante seleccionar adecuadamente el explante y garantizar la asepsia para establecerlo en un medio de cultivo adecuado para la especie. Para ello, se deben utilizar agentes químicos que aseguren la asepsia de los explantes, como alcohol, hipoclorito de sodio, cloruro de mercurio, peróxido de hidrógeno, etc. (Bello-Bello y Spinoso-Castillo, 2023).

Etapas 2: Multiplicación o proliferación de brotes. El objetivo de esta etapa es obtener el mayor número posible de brotes de cultivo a partir de los explantes de los cuales cada uno dará origen a una nueva plántula para ciclos sucesivos de multiplicación. En este proceso, pueden expresarse genotipos que no lo hacían en la planta madre, debido a las variaciones en los de macro y microelementos, así como los balances de hormonas presentes en el medio de cultivo (Rodríguez-Aguilar *et al.*, 2021).

Etapas 3: Elongación y enraizamiento. En la segunda etapa se obtienen brotes, los cuales en su mayoría carecen de raíces y tienen pocas probabilidades de adaptarse con éxito a las condiciones ambientales externas (Ramírez, 2024). Por lo tanto, en esta etapa se busca que los brotes desarrollen su sistema radical y aumenten su tamaño, lo que facilita su manipulación y mejora las probabilidades de adaptación a las condiciones de invernadero para su aclimatación (Bello-Bello y Spinoso-Castillo, 2023).

Etapas 4: Aclimatación. Las plantas generadas *in vitro* a menudo presentan deficiencias fisiológicas y morfológicas que dificultan su proceso de adaptación al medio externo, siendo sensibles a los cambios ambientales. El éxito o el fracaso de la micropropagación depende de la aclimatación, ya que esta etapa se ve afectada por la pérdida de plantas (Aguilera y Antezana, 2020; Ramírez, 2024). El objetivo de esta fase es asegurar la supervivencia de las plántulas durante el trasplante y favorecer su crecimiento bajo condiciones de invernadero (Bello-Bello y Spinoso-Castillo, 2023).

Aclimatación

Entre unos de los problemas del cultivo *in vitro* está la aclimatación, también conocida como endurecimiento, es un proceso crítico que consiste en transferir las plantas de las

condiciones *in vitro* (laboratorio) a las condiciones *ex vitro* (campo o invernadero). Durante este proceso, las plantas se adaptan gradualmente a nuevas condiciones climáticas y ambientales, enfrentando grandes dificultades debido al estrés abiótico y biótico (Oliveira *et al.*, 2013).

Esta es una etapa crucial en la propagación de orquídeas, ya que afecta la supervivencia de las plantas y existen altos porcentajes de pérdidas cada vez que se transfieren a condiciones *ex vitro* (Vasco-Ávila, 2020; Deb y Imcen, 2010; Torres *et al.*, 2006). Además, en la micropropagación comercial, este paso es a menudo un factor limitante debido a la participación de más mano de obra y dinero por una alta mortalidad (Conner y Conner 1984 en Hazarika *et al.*, 2006)

Aclimatación de orquídeas a condiciones *ex vitro*

En las orquídeas, este proceso se vuelve aún más crítico debido a que su hábito de crecimiento es epífito y las raíces son el principal órgano encargado de absorber nutrientes y realizar fotosíntesis. Las plántulas pueden secarse o marchitarse rápidamente, esto puede provocar una alta tasa de mortalidad (Kumar y Rao, 2012; Chandra *et al.*, 2010).

Proceso de aclimatación

Las plantas cultivadas *in vitro* presentan condiciones ambientales diferentes a las plantas cultivadas en campo. Las cultivadas *in vitro* se desarrollan en condiciones asépticas, con baja intensidad de luz en un medio con nutrientes y alta humedad relativa. Estas condiciones dan lugar a la formación de plántulas con morfología, anatomía y fisiología anormales. Presentan un tallo verde blando, estomas inactivos, un sistema radicular débil, desarrollo cuticular deficiente, transpiración excesiva, cutícula poco desarrollada y susceptibilidad a los patógenos (Bag *et al.*, 2019).

Es por eso por lo que se requiere de un proceso para preparar a la planta para las condiciones naturales a las que se enfrentará, mediante un proceso de endurecimiento y corregir las anomalías de manera gradual. El grosor de las hojas generalmente aumenta, el mesófilo de las hojas progresa en diferenciación en parénquima empalizado y esponjoso, la forma estomática cambia de circular a elíptica, se produce una regulación estomática eficaz de la transpiración, lo que conduce a la estabilización del potencial hídrico de las plántulas transferidas al campo (Lavanya *et al.*, 2009).

Factores que afectan el crecimiento de las plántulas durante la aclimatación

En los últimos años se han considerado algunos factores críticos que afectan el crecimiento de las plantas durante la etapa de aclimatación, como la condición de las

plántulas, la intensidad de la luz, la humedad relativa, la temperatura, el medio de plantación además de los factores nutricionales y el control de patógenos (Irsyadi, 2021). Gutiérrez *et al.* (1998) (citado por Vera-Tudela, 2011), consideran algunos factores para el desarrollo de las orquídeas en aclimatación como:

- **Intensidad de luz**

Las plántulas en crecimiento *in vitro* se encuentran bajo condiciones de baja intensidad de luz y temperatura por lo que la transferencia directa a luz solar de amplio espectro podría causar carbonización o quemaduras de las hojas y puede llegar a secarse. Por lo tanto, es necesario adaptar a las plántulas a condiciones naturales de invernadero (Chandra *et al.*, 2010). Los requerimientos de luz y temperatura de las orquídeas varían en función al género o especie; las de clima frío toleran hasta temperaturas de 10 °C, mientras las de clima cálido por encima de los 21°C.

- **Humedad relativa**

El retraso en el desarrollo de la cutícula, de las ceras epicuticulares y de los estomas durante el cultivo *in vitro*, provoca altas tasas de transpiración estomática y cuticular de las hojas en las plántulas cuando se sacan del cultivo *in vitro*. Para evitar esto, las plántulas deben transferirse lentamente de condiciones de alta humedad a condiciones de baja humedad. Las orquídeas prefieren abundante agua, pero no crecen bien en sustratos permanentemente húmedos o saturados.

- **Concentración de carbohidratos**

Bajo condiciones *in vitro* las plántulas se desarrollan en un medio de cultivo con azúcar y nutrientes para permitir su crecimiento heterotrófico; por lo que la concentración de carbohidratos influye en el proceso de aclimatación debido a que las plantas cambian del crecimiento heterotrófico a un estado autótrofo.

- **Sustratos**

Sánchez *et al.* (2024) mencionan que el sustrato desempeña un papel importante en la aclimatación y desarrollo de las orquídeas, es el soporte y la fuente de agua, aireación y nutrientes. Así mismo, Vera-Tudela, (2011) indica que, para ser adecuado, el sustrato debe contar con ciertas características: ser inerte, duradero, ligero, y con buen drenaje.

Por ende, es necesario preparar a la planta a las condiciones naturales a las que se enfrentará mediante un proceso de endurecimiento (Lavanya *et al.*, 2009). Además de las condiciones físicas para la aclimatación, se ha demostrado que existen biomoléculas y compuestos que pueden inducir el endurecimiento; al respecto, se ha demostrado que el

uso del AS desempeña funciones importantes en diferentes procesos fisiológicos y biológicos de la aclimatación, por lo que puede ser una alternativa para en la adaptación de microplantas a condiciones *ex vitro* (Tucuchuc *et al.*, 2021).

2.6 Ácido salicílico

El ácido salicílico es una hormona vegetal que actúa como molécula señal en mecanismos de defensa en las plantas. Forma parte de un amplio grupo de compuestos fenólicos, se encuentra naturalmente en diversas plantas, especialmente en la corteza del sauce (*Salix*), de donde proviene su nombre, y de donde era extraído directamente de la corteza; no obstante, en la actualidad se obtiene sintéticamente (Burgos, 2024; Horváth *et al.*, 2007).

2.6.1 El AS en la fisiología en plantas

El AS participa en procesos fisiológicos importantes. Algunos estudios mencionan que puede estimular el crecimiento radicular, como en el maíz que en concentraciones con 1 y 0.01 μM se incrementa la longitud de raíces hasta 30.6 % (Tucuch-Haas *et al.*, 2016). Otro estudio demuestra que en semillas de tomate con 1 y 0.01 μM se estimula la diferenciación de raíces secundarias (Dzib-Ek *et al.*, 2021).

Adicionalmente, se ha descrito que el AS participa en procesos para mejorar la calidad y rendimiento en cultivos. Sánchez-Chávez *et al.* (2011), reportan que en chile jalapeño las dosis de 0.1 y 0.2 μM incrementan las variables de crecimiento, concentración de pigmentos, actividad fotosintética, contenido nutricional y productividad. En plántulas de jitomate y trigo asperjadas con 1 μM se incrementó la altura, el peso fresco y la longitud la raíz (Tucuch Haas *et al.*, 2015; Larqué-Saavedra *et al.*, 2010). La aplicación de 0.02 μM aumentó el rendimiento y calidad de frutos de tomate (Vázquez-Díaz *et al.*, 2016). También se ha reportado que la aspersión de AS en frutales como arándano y café retarda el proceso de maduración y preserva su firmeza (Ramos-Bell *et al.*, 2024; Unigarro *et al.*, 2018).

Además, participa en respuestas al estrés biótico (resistencia a los patógenos e inducción de la resistencia sistémica) y abiótico (tolerancia a la sequía, a la salinidad y a bajas temperaturas). Por ejemplo, en microplantas de papa genera tolerancia a bajas temperaturas (Mora-Herrera y López-Delgado, 2006).

2.6.2 Efectos del AS en el desarrollo y aclimatación *ex vitro*

Al respecto, se ha demostrado que el uso del AS en concentraciones adecuadas desempeña funciones importantes en el crecimiento y la aclimatación *ex vitro* (Martín-Mex *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2015). La respuesta de las plantas al AS depende de las condiciones

ambientales, la especie, la variedad, el genotipo, la concentración, la forma y el momento de aplicación (Batista *et al.*, 2019).

Por ejemplo, Olivares-Aguilar (2020) reportó que en microplantas de *L. autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp. precultivadas en AS 10 μM mostraron un incremento en la biomasa y en la supervivencia, respecto a las no precultivadas en AS. En otra especie de orquídea *Dendrobium officinale* se asperjó AS y la dosis favoreció la producción de los polisacáridos con una concentración de 100 μM (Yuan *et al.*, 2014).

Por otro lado, en microplatas de *L. autumnalis* tratamientos con AS redujeron la oxidación de explantes para inducir procesos morfogénicos e indujo la formación de procesos morfogénicos (Ceballos-Vásquez, 2023).

El AS desempeña funciones importantes; sin embargo, en concentraciones altas puede ocasionar daño fisiológico que altera el desarrollo (Horváth *et al.*, 2007). Mantovani, (2020) evaluó el AS en dos especies de orquídeas epífitas *Phalaenopsis* Golden Peoker y *Cymbidium atropurpureo*, y encontró que en la concentración de 50 μM se redujo altura de la planta, número de raíces y hojas, además de que también indujo toxicidad. Por las respuestas diferenciales que puede desencadenar el AS en las plantas, en este trabajo se propuso estudiar el efecto en el desarrollo y la aclimatación *ex vitro* de especies de *G. aurantiaca* y *L. anceps*.

3. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con el objetivo de desarrollo sostenible 15 “vida de ecosistemas terrestres”, se deben tomar medidas urgentes para evitar la pérdida de los bosques, la degradación del suelo y la extinción de las especies. Lo que hace necesario proteger y restablecer los ecosistemas terrestres, gestionar sosteniblemente los bosques, luchar contra la desertificación, detener e invertir la degradación de las tierras y contener la pérdida de la biodiversidad (UNDP, 2015).

En México, la mayor diversidad de orquídeas se encuentra en tres tipos de vegetación: bosque tropical perennifolio, bosques templados de encino y bosques mesófilos de montaña (Hágsater *et al.*, 2005). Siendo consideradas como recursos forestales no maderables que presentan gran importancia ecológica, dado que juegan un papel crucial en el ciclo de nutrientes como el carbono, nitrógeno y fósforo; además, proporcionan hogar para especies de animales pequeños, insectos, aves y lagartos (Piña-Torres, 2021). Las flores han desarrollado numerosas estrategias para lograr la polinización; existen especies que aparentan ser alimento y son capaces de imitar a insectos hembra para atraer

a los insectos macho (Cox-Tamay *et al.*, 2020). Además, tienen gran importancia económica a nivel mundial, siendo de las especies más buscadas por los consumidores, debido a la longevidad de sus flores y su simbolismo particular y sofisticado (Seidel-Júnior y Venturieri, 2011). Más aún, ofrecen una serie de beneficios tanto medicinales, como de alimento.

Sin embargo, la deforestación, el cambio de uso de suelo, la recolección excesiva de ejemplares silvestres para el comercio ilegal, la presión demográfica humana, las carencias en la legislación, la política ambiental, y la falta de participación de las comunidades, aunado a que la propagación vegetativa es lenta y poco redituable (Maharjan *et al.*, 2020), han propiciado que 190 especies de orquídeas se incluyan en alguna categoría de riesgo de acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010).

Las orquídeas como recurso fitogenético se pueden conservar de manera *in situ* o *ex situ* (Menchaca-García *et al.*, 2011). La conservación *in situ* se refiere al cuidado de la biodiversidad en su hábitat natural, es la manera más apropiada de conservación de especies ya que permite proteger las poblaciones de especies de flora y fauna silvestres. Este tipo de conservación requiere estrategias de diferentes tipos que permitan la preservación natural como las Áreas Naturales Protegidas (ANP), Unidades de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre (UMA).

La conservación *ex situ*, es la estrategia de conservación de plantas genes o genotipos fuera de su ambiente natural, para uso actual o futuro. Dentro de las herramientas de este tipo de conservación, se encuentra la contribución de los jardines botánicos, plantaciones de conservación a partir de semillas o partes vegetativas, colecciones de plantas y los bancos de germoplasma mediante el ADN, polen, yemas, o la criopresevación (Pisanty *et al.*, 2016).

Por lo anterior expuesto, es necesario establecer medidas que coadyuven a reestablecer las poblaciones y su conservación, tomando en cuenta diversas estrategias como la biotecnología, y el uso de moléculas señal como el AS, que puede ser implementada a través del cultivo *in vitro* para la producción de orquídeas en riesgo, en donde la aclimatación es una de las etapas más críticas, debido a que existen altos porcentajes de plantas dañadas y pérdidas (Velázquez, 2019; Deb y Imchen, 2010).

En este proyecto se estudiaron dos especies de orquídeas: *G. arauntiacae* y *L. anceps*; ambas son epifitas de origen mexicano, se caracterizan por tener flores vistosas y llamativas, lo que hace que sean extraídas de sus hábitats naturales para diferentes fines.

Aunque todavía no se encuentren en alguna categoría de riesgo en la NOM-059-SEMARNAT-2010, es importante como medida preventiva establecer procesos de propagación masiva para contribuir a la disminución de la presión que actualmente sufren sus poblaciones silvestres, además de que para la especie de *G. arauntiac*a hay poca información sobre el proceso de aclimatación.

4. HIPÓTESIS

El ácido salicílico participa en los procesos de desarrollo e inducción de tolerancia al estrés abiótico en plantas, por lo que favorecerá el crecimiento y la supervivencia *ex vitro* de microplantas de *G. aranuntiacaca* y *L. anceps*.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar el efecto del ácido salicílico en el desarrollo y la supervivencia *ex vitro* de microplantas de *G. aurantiaca* y *L. aelia anceps*.

5.2 Específicos

- Evaluar el efecto en el desarrollo *in vitro* de microplantas de *G. aurantiaca* y *L. anceps* precultivadas en ácido salicílico.
- Evaluar la supervivencia *ex vitro* de microplantas precultivadas en ácido salicílico de *G. aurantiaca* y *L. anceps*.

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, Estado de México, ubicado en la Carretera Tenancingo-Villa Guerrero Km. 1.5, en las coordenadas geográficas 18°58'6.05" norte y 99°36'48.2" oeste, a 2,053 msnm.

6.2 Material biológico

Para la especie de *G. aurantiaca* se utilizaron semillas procedentes de cápsulas inmaduras donadas de una colección de traspatio en el municipio de "Ixtapan de la Sal" pertenecientes al Ing. Juan Manuel Olivares Aguilar. A partir de estas semillas se obtuvieron vitroplantas que fueron cultivadas durante 18 meses (más dos meses de germinación) (Fig. 3).



Figura 3. Vitroplantas de *G. aurantiaca* cultivadas por 18 meses en medio Murashige y Skoog.

En el caso de *L. anceps*, se utilizaron vitroplantas desarrolladas en medio MS por 6 meses (Fig. 4), donadas por la unidad de manejo de orquídeas de la Dra. María Ascensión Aguilar Morales, posdoctorante CONAHCYT del Centro Universitario UAEMéx Tenancingo.



Figura 4. Vitroplantas de *L. anceps* desarrolladas por 6 meses en medio Murashige y Skoog.

6.3 Condiciones de cultivo *in vitro*

Los cultivos *in vitro* de *G. aurantiaca* y *L. anceps* se mantuvieron en condiciones controladas en un cuarto de incubación a temperatura de 23 ± 2 °C, con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad y una radiación de *ca* $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$, 400-700 nm.

a) Medio de cultivo de propagación

Se empleó medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con modificaciones de Espinoza *et al.* (1986). Se preparó mezclando las cantidades requeridas de sales inorgánicas (Tabla 3); partiendo de soluciones concentradas de acuerdo con Mora-Herrera (2007) (Tabla 4), se adicionó sulfato de magnesio (MgSO_4) 0.37 g L^{-1} , inositol 0.1 g L^{-1} , sulfato de hierro (FeSO_4) 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} y azúcar 30 g L^{-1} . Una vez aforado a 1000 mL, se ajustó el pH entre 5.6 y 5.7 con hidróxido de potasio (KOH) 1N. Finalmente, como agente gelificante se agregó 7.5 g L^{-1} de agar bacteriológico el cual se disolvió con calor. y se adicionaron 25 ml por recipiente. Los medios de cultivo y materiales de siembra se esterilizaron en una autoclave (Tuttnauer modelo 2540E) a 115 lb a temperatura de 120 °C, durante 15 minutos.

Tabla 3. Composición química y cantidades requeridas para las sales del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS).

Reactivo	Fórmula	Cantidad para 1000 mL	Marca
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	17.5 g	Baker®
Nitrato de potasio	KNO_3	20 g	Baker®
Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.5 g	Baker®
Fosfato de potasio	KH_2PO_4	1.75 g	Baker®
Ácido bórico	H_3BO_3	50 mg	Sigma®
Sulfato de manganeso	MnSO_4	200 mg	Baker®
Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100 mg	Baker®
Yoduro de potasio	KI	10 mg	Baker®
Molibdato de sodio	Na_2MoO_4	2.5 mg	Baker®
Sulfato cúprico (5.0 mg)	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}^*$	0.5 mL de la solución	Baker®
Cloruro de cobalto (5.0 mg)	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}^*$	preparada	

*Nota: de cada una de estas sustancias se pesaron 5 mg que se disolvió en agua destilada, se aforó a 10 mL y se tomó 0.5 mL L⁻¹.

Tabla 4. Soluciones concentradas para el medio de cultivo (Mora-Herrera, 2007).

Solución	gL ⁻¹	Marca
Sales	4.4	
Sulfato de magnesio (MgSO4)	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®

b) Medio de cultivo con AS

Se usó medio MS básico al 100 %, como fue descrito en el punto 6.3.2 más las concentraciones respectivas de AS: 0 (testigo), 10, 50 y 100 µM, que se tomaron de una solución concentrada de 20 mg en 50 mL (Fig. 5a). Previamente el AS se disolvió con hidróxido de potasio (KOH) 1N antes de aforar. Para el tratamiento con 100 µM, se pesó y se disolvió directamente en los medios (Fig. 5b).

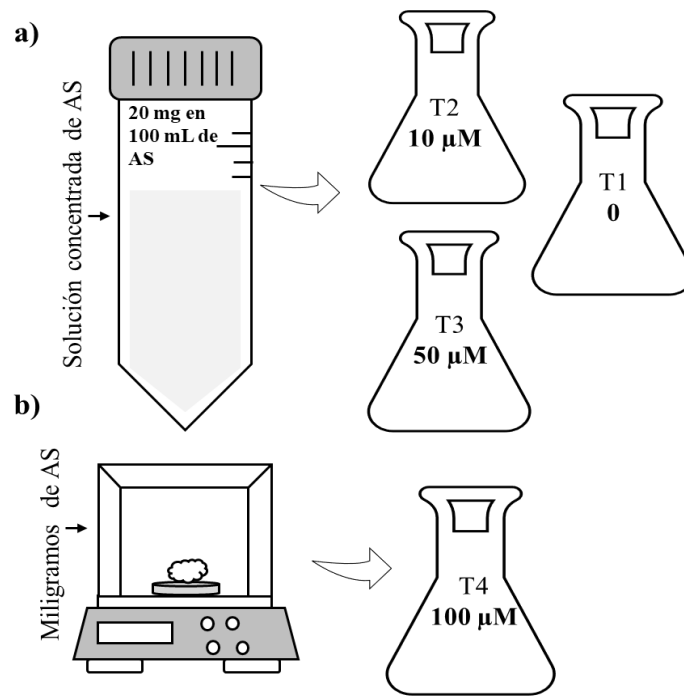


Figura 5. Concentraciones de AS para los medios de cultivo en cada tratamiento, a) solución concentrada 20 mg en 100 mL de AS para los tratamientos 2 (10 μM) y 3 (50 μM), b) peso directo para el tratamiento 4 (100 μM).

6.4 Condiciones de cultivo *ex vitro*

Para el trasplante de las vitroplantas de *G. arautiaca* y *L. anceps* se usaron domos rectangulares (41.5 x 31 x 11 cm), a los cuales se les realizaron dos salidas de aire. En cada domo se colocaron charolas de germinación (36.5 x 27 x 4 cm, 96 cavidades) (Fig. 6), que se llenaron con sustrato estéril de corteza de pino, peat moss (premier sphagnum peat moss), carbón y perlita en relación 1:1:1:1 v/v (Fig. 7) (Bello-Castañeda *et al.*, 2023). El sustrato se esterilizó en una autoclave de presión a 120 °C durante 15 minutos y se llevó a capacidad de campo con agua destilada estéril.

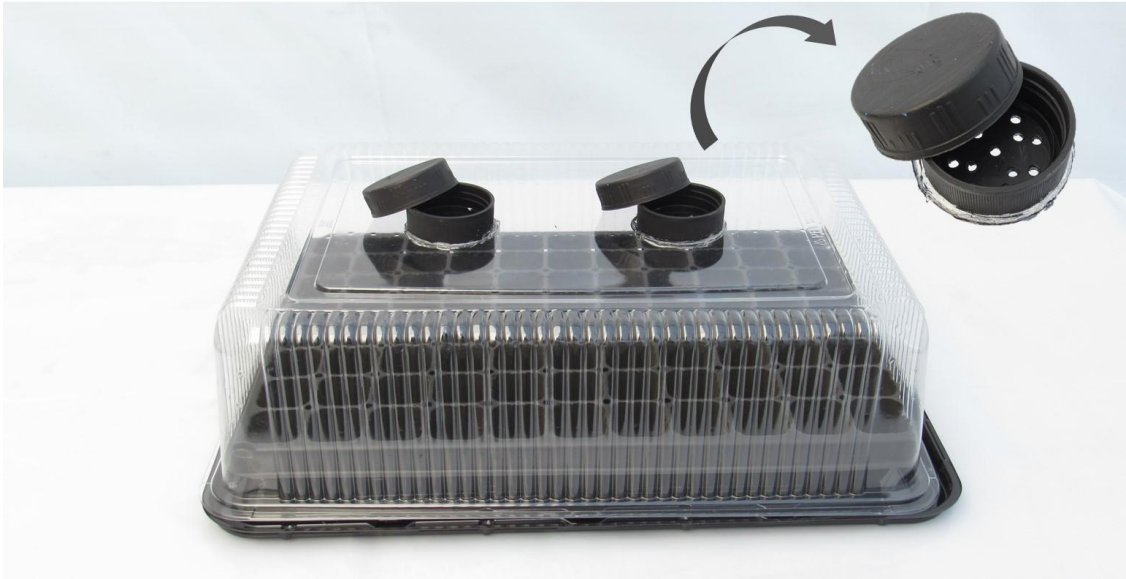


Figura 6. Acondicionamiento de los domos para su utilización en la aclimatación de vitroplantas de *G. arautiaca* y *L. anceps*.



Figura 7. Sustratos utilizados en la aclimatación *ex vitro* de *G. arautiaca* y *L. anceps*: a) carbón vegetal, b) perlita, c) corteza de pino y d) peat moss.

6.5 Descripción de los experimentos en cultivo *in vitro*

G. aurantiaca

1) Germinación y subcultivos

Las semillas de *G. aurantiaca* se germinaron a partir de cápsulas inmaduras en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50 % (descrito en el punto 6.3.1), por el método de “Siembra de semillas utilizando cápsulas verdes” propuesto por Menchaca-García y

Moreno, (2011). Una vez germinadas y desarrolladas (~2 meses) las vitroplantas se subcultivarán a medio MS al 100 % en frascos Gerber® de 70 mL con 20 mL de medio. En estas condiciones permanecieron 9 meses.

Posteriormente, con el fin de evitar la pérdida de nutrientes y agua del medio de cultivo, se realizaron dos subcultivos más en iguales condiciones, uno a los 5 meses y otro después de 4 meses (18 meses de cultivo *in vitro* en total). Finalmente, las vitroplantas se subcultivaron en tubos de ensaye (25 x 150 mm) con 20 mL de medio MS al 100 % con las concentraciones de AS: 0, 10, 50 y 100 µM. En cada tubo se colocó una vitroplanta completa de aproximadamente 1-2 cm de longitud, con al menos una raíz y dos hojas. Las vitroplantas se mantuvieron en estas condiciones durante 3 meses (Fig. 8), posteriormente pasaron a condiciones *ex vitro*.

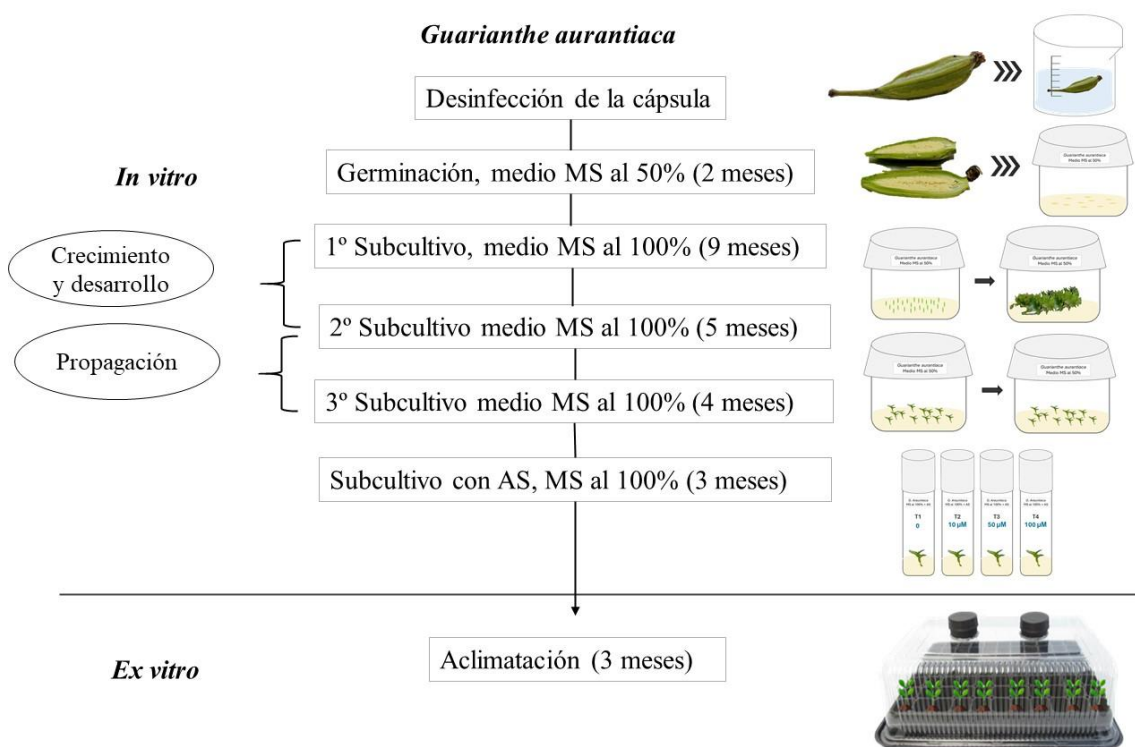


Figura 8. Diagrama de la descripción del experimento y desarrollo *in vitro* y *ex vitro* de microplantas de *G. aurantiaca* precultivadas en AS.

Laelia anceps

Las vitroplantas de 6 meses de edad de *L. anceps*, se subcultivaron a medio MS al 100 % en frascos Gerber® de 70 mL, con 20 mL de medio. En cada frasco se colocaron cuatro microplantas. A los 3 meses del primer subcultivo, las vitroplantas se subcultivaron por 3 meses en tubos de ensaye con 10 mL de medio MS al 100 % con las concentraciones de

AS: 0, 10, 50 o 100 μM . En cada tubo se colocó una vitroplanta completa de aproximadamente 1-2 cm de longitud, con al menos una raíz y dos hojas (Fig. 9), posteriormente pasaron a condiciones *ex vitro*.

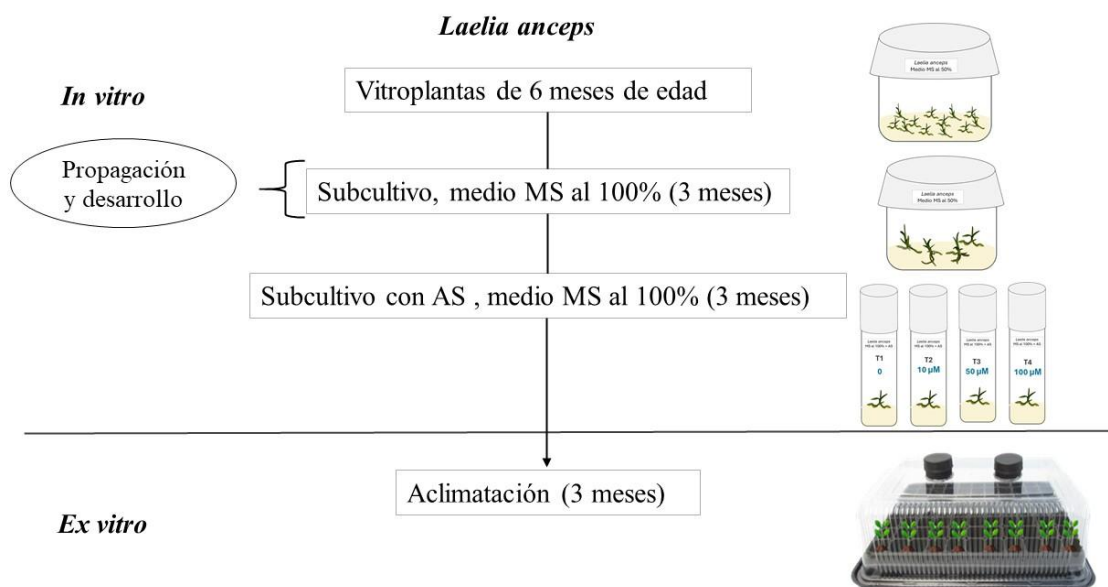


Figura 9. Diagrama de la descripción del experimento y desarrollo *in vitro* y *ex vitro* de microplantas de *L. anceps* precultivadas en AS.

6.5.3. Variables evaluadas

Para las microplantas de las dos especies antes y después del pretratamiento con AS se evaluaron las siguientes variables:

- Porcentaje de supervivencia *in vitro* después de estar 3 meses precultivadas en AS, considerando como planta viva si al menos tenía dos hojas y dos raíces verdes y vigorosas aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{N^{\circ} PV \times 100}{N^{\circ} IP}$$

N°PV = Número de plantas vivas al término del experimento

N° IP = Número inicial de plántulas

- Longitud de raíces y hojas de cada vitroplanta, haciendo uso del programa ImageJ (Rasband, 2023).
- Número de raíces y de hojas de cada vitroplanta.

- Peso fresco, evaluado en una balanza analítica Máx 120g d= 0.0001g (Adam Equipment®).

6.5.4. Diseño experimental

Se estableció un diseño experimental completamente al azar, con 4 tratamientos y 10 repeticiones para la especie *G. arautiaca* y 20 repeticiones para la especie *L. anceps*. Los datos obtenidos se evaluaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y se realizó la prueba de comparación de medias Tukey ($p \leq 0.05$).

6.6 Descripción de los experimentos en aclimatación *ex vitro*

Una vez transcurridos los 3 meses del cultivo con AS, las condiciones ambientales se modificaron de forma gradual, por lo que la aclimatación consistió en las siguientes fases:

Fase 1: se permitió la entrada de aire destapando cada tubo de ensaye que contenía una planta, por 7 días en el cuarto de incubación de laboratorio (20 ± 2 °C, con un fotoperiodo 16 horas luz, y radiación de *ca* $35 \mu\text{mol m}^2 \text{seg}^{-1}$).

Fase 2: trascurridos 7 días, las microplantas se extrajeron de los tubos de ensaye con pinzas estériles, se sumergieron en agua tibia para eliminar el exceso de agar y evitar la contaminación. Se colocaron en una solución de microdin al 0.082 % (30 mL en 70 mL de agua) por 2 minutos y por último en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) durante 2 minutos. Enseguida, las plantas se colocaron en domos rectangulares como se describe en el apartado 6.4 (Fig. 7) que contenían sustrato y se fueron modificando las condiciones ambientales para continuar con la aclimatación de manera gradual (Tabla 5).

Fase 3: los domos se mantuvieron cerrados y sellados con plástico autoadherente (Kleen Pack®) en condiciones de la incubadora, por 8 días (23 ± 2 °C, con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad y una radiación de *ca* $35 \mu\text{mol m}^2 \text{seg}^{-1}$).

Fase 4: posteriormente los domos fueron trasladados a condiciones de laboratorio, donde se les retiro el plástico autoadherente y se realizó el primer riego con el fungicida Captan 60®, durante un periodo de ocho días.

Posteriormente, los domos fueron trasladados a condiciones de laboratorio, donde se les retiró el plástico autoadherente y se realizó el primer riego con el fungicida Captan 60®, durante un periodo de ocho días.

Fase 5: con el fin de seguir adaptando las vitroplantas a condiciones ambientales externas, los domos se trasladaron a un invernadero no tecnificado con malla sombra al 80 %, con

riegos cada dos días y las salidas de aire abiertas, durante 10 días. Luego se retiraron las salidas de aire de los domos y se redujeron los riegos cada tercer día en los próximos 35 días.

Fase 6: se cambió la malla sombra al 70 % y con el domo semiabierto, se continuó con riegos de cada tres días, durante 16 días.

Fase 7: finalmente los domos se abrieron completamente, con riegos de cada tercer día durante 8 días (Fig. 10).

Tabla 5. Condiciones ambientales para la aclimatación *ex vitro* en las que se mantuvieron las vitroplantas de *G. arauntiac*a y *L. anceps* precultivadas en AS.

Núm. m.	Sitio	Condiciones del domo	Tiempo (días)	Frecuencia de riego	Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)	Intensidad luminosa ($\mu\text{mol m}^2 \text{seg}^{-1}$)
1	Incubadora	Sin domo	8	No aplica	22	90 %	35
2	Incubadora	Completamente cerrado	8	Sin riego	23	90 %	35
3	Laboratorio	Cerrado, con las salidas de aire abiertas	8	c/2 días	25	80 %	35
4	Invernadero (malla sombra 80 %)	Cerrado con las salidas de aire abiertas	10	c/2 días	26 ± 2	80%	100
5	Invernadero (malla sombra 80 %)	Cerrado sin salidas de aire	26	c/3 días	26 ± 2	70 %	100
6	Invernadero (malla sombra 70 %)	Abierto	10	c/2 días	28 ± 2	65 %	220

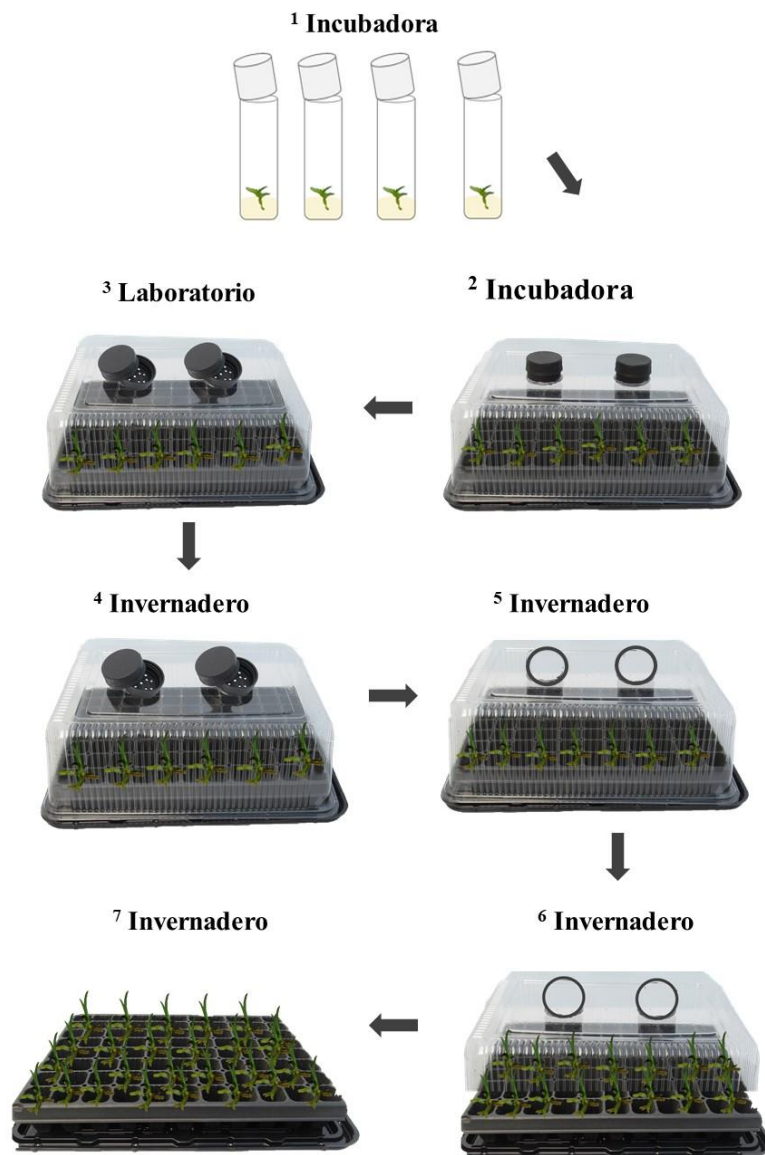


Figura 10. Diagrama de las etapas del desarrollo *ex vitro* de microplantas de *G. aurantiaca* y *L. anceps* precultivadas en AS.

6.5.1 Variables evaluadas

Después de 70 días de la aclimatación *ex vitro* se evaluó el porcentaje de supervivencia, considerando como planta viva a aquellas que al menos tenían dos hojas y dos raíces verdes y vigorosas, aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{N^{\circ} PV \times 100}{N^{\circ} IP}$$

$N^{\circ}PV$ = Número de plantas vivas al término del experimento

$N^{\circ}IP$ = Número inicial de plántulas

6.5.2 Diseño experimental

Se estableció un diseño experimental completamente al azar, con 4 tratamientos y 27 repeticiones. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y se realizó la prueba de comparación de medias Tukey ($p \leq 0.05$).

7. RESULTADOS

7.1. Evaluación del efecto de la preincubación con AS en el desarrollo *in vitro* de microplantas de *G. aurantiaca* y *L. anceps*

7.1.1. *Guarianthe aurantiaca*

Supervivencia *in vitro*

En las microplantas de *G. aurantiaca* precultivadas en AS se observó una tendencia a inhibición de la supervivencia *in vitro*, en comparación con el testigo. Particularmente, la concentración de 100 μM de AS redujo la supervivencia hasta en un 10.82 % con respecto al control. Si bien ninguna de las concentraciones evaluadas resultó letal para el desarrollo de las microplantas bajo estas condiciones; sin embargo, en esta etapa *in vitro* la supervivencia se ve afectada negativamente, posiblemente debido a la sensibilidad de esta especie al estrés inducido por la molécula en las concentraciones evaluadas (Tabla 6, Fig. 16).

Tabla 6. Supervivencia de microplantas de *G. aurantiaca* precultivadas en AS durante 3 meses.

Tratamiento	Concentración de AS	Supervivencia <i>in vitro</i> (%)*
T0	0 μM	92.50
T1	10 μM	92.50
T2	50 μM	90.00
T3	100 μM	82.50

*Los resultados corresponden al porcentaje de supervivencia respecto a las 10 microplantas por tratamiento cultivadas en AS.

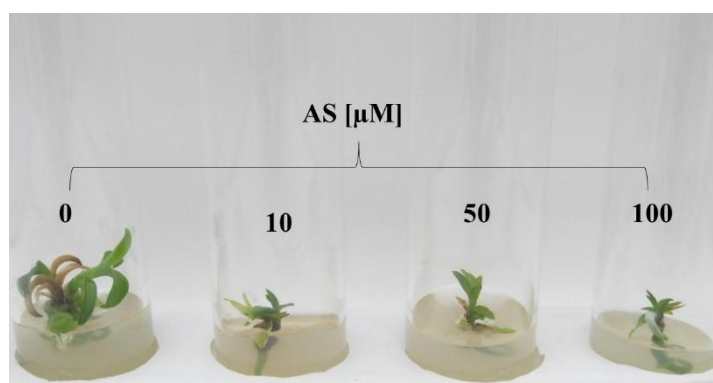


Figura 11. Vitroplantas de *G. aurantiaca* precultivadas en AS durante 3 meses.

Longitud de raíces y de hojas

Las microplantas de *G. aurantiaca* precultivadas en AS, mostraron una tendencia a la inhibición del crecimiento con respecto al testigo, especialmente en las concentraciones 50 y 100 μM de AS, donde se redujo hasta un 21.1 % la longitud de raíces (Fig. 11) y 20.97 % en la longitud de las hojas (Fig. 12).

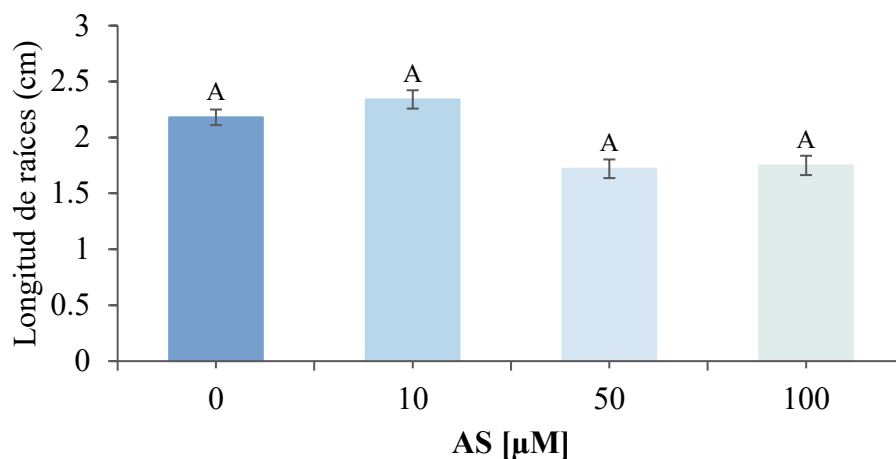


Figura 12. Longitud de raíces de microplantas de *G. arauantiaca* precultivadas durante 3 meses en AS. Los resultados corresponden al promedio de 10 repeticiones por tratamiento, \pm e.s. Las barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $p < 0.05$).

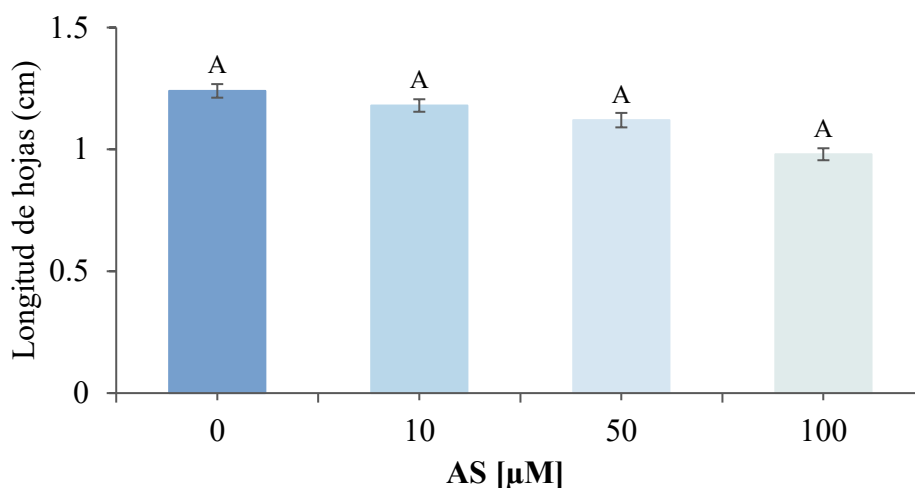


Figura 13. Longitud de hojas de microplantas de *G. arauantiaca* precultivadas 3 meses en AS. Los resultados son el promedio de 10 repeticiones por tratamiento, \pm e.s. Las barras con la misma letra son estadísticamente iguales. Diferencia estadística (Tukey, $p < 0.05$).

Número de raíces y de hojas

Se observó una respuesta similar a la de longitud de raíces y hojas, con tendencia a la inhibición en microplantas tratadas con AS. Especialmente con la concentración más alta de 100 μM de AS el número de raíces y de hojas se redujo hasta un 28.89 % (Fig. 13) y un 32.58 % (Fig. 14) respectivamente en comparación con el testigo.

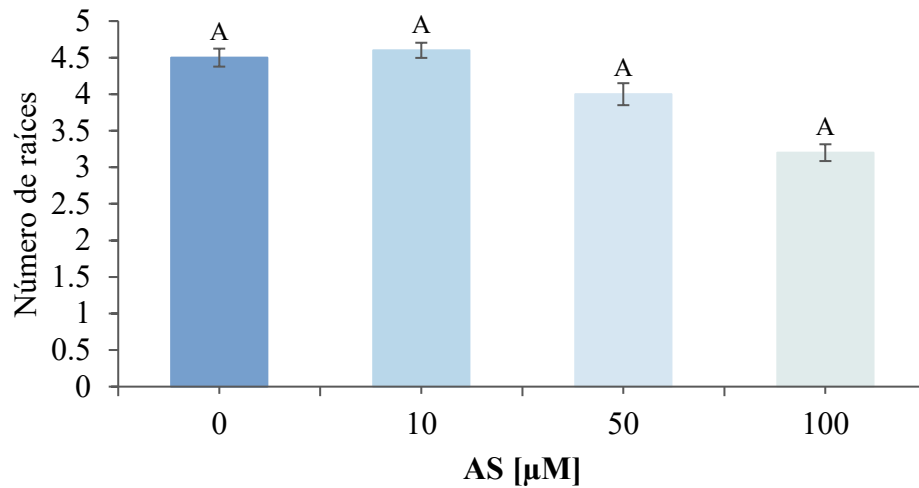


Figura 14. Número de raíces de microplantas de *G. arauantiaca* precultivadas 3 meses en AS. Los resultados son el promedio de 10 repeticiones por tratamiento, \pm e.s. Las barras con la misma letra son estadísticamente iguales. Diferencia estadística (Tukey , $p < 0.05$).

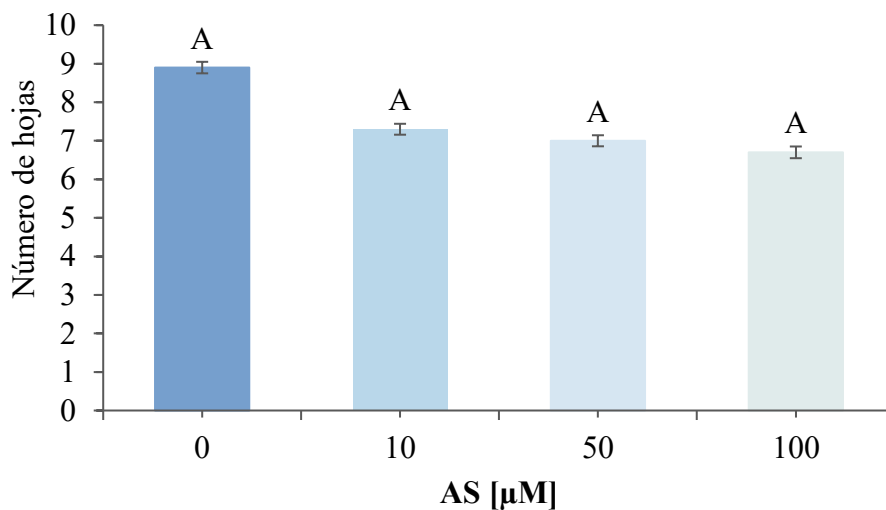


Figura 15. Número de hojas de microplantas de *G. arauantiaca* precultivadas 3 meses en AS. Los resultados son el promedio de 10 repeticiones por tratamiento, \pm e.s. Las barras con la misma letra son estadísticamente iguales. Diferencia estadística (Tukey , $p < 0.05$).

Peso fresco

En las microplantas de *G. arauantiaca* precultivadas con 10 y 100 µM de AS, el peso fresco se inhibió en un 26.83 %, y con 50 µM 71.5 %, con respecto al testigo (Fig. 15).

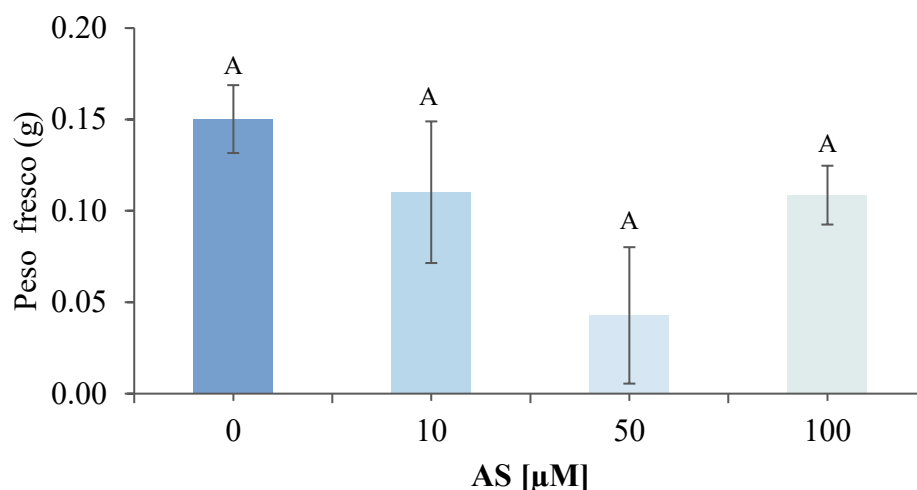


Figura 16. Peso fresco de microplantas de *G. arautiaca* precultivadas 3 meses en AS. Los resultados son el promedio de 10 repeticiones por tratamiento, \pm e.s. Las barras con la misma letra son estadísticamente iguales. Diferencia estadística (Tukey, $p < 0.05$).

7.1.2 *Laelia anceps*

Supervivencia *in vitro*

En las microplantas de *L. anceps* precultivadas en AS, la supervivencia *in vitro* se redujo hasta en 12.13 % en comparación con el testigo (Tabla 7, Fig. 22).

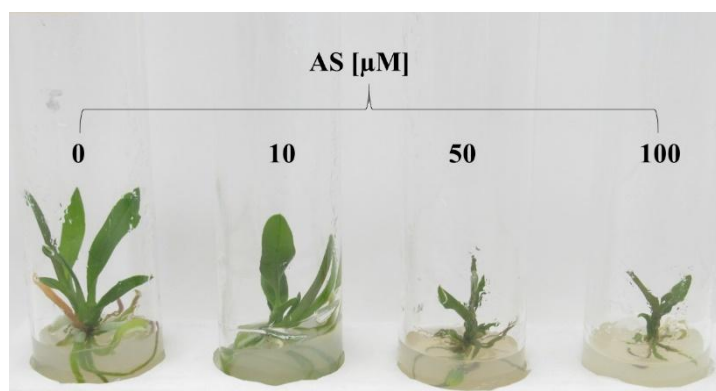


Figura 11. Vitroplantas de *L. anceps* precultivadas en AS durante 3 meses.

Tabla 7. Porcentaje de supervivencia de microplantas de *L. anceps* precultivadas en AS durante 3 meses.

Tratamiento	Concentración de AS	Sobrevivencia <i>in vitro</i> (%)*
T0	0 µM	82.50
T1	10 µM	72.50
T2	50 µM	72.50
T3	100 µM	72.50

*Los resultados son el porcentaje de supervivencia con respecto a las 20 microplantas por tratamiento.

Longitud de raíces y de hojas

En las microplantas de *L. anceps* precultivadas en AS, se observó una inhibición significativa en la longitud de raíces a las concentraciones de 50 y 100 μM de AS, reduciéndose a 25.71 % y 43.14 %, respectivamente con referencia al testigo (Fig. 17). Por otro lado, en todos los tratamientos con AS, se observó un incremento significativo en la longitud de hojas en comparación con el testigo. En la dosis de 10 μM incrementó 1.78 veces, en 50 y 100 μM hasta 1.18 veces (Fig. 18).

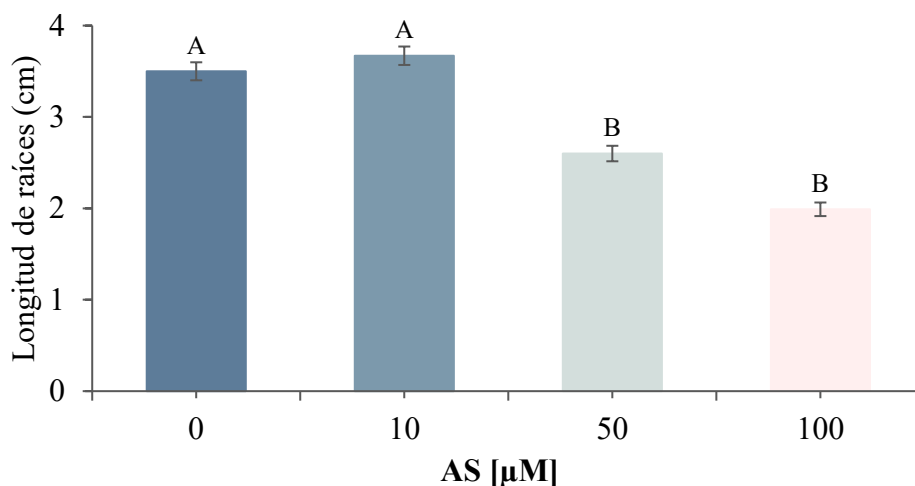


Figura 12. Longitud de raíces de microplantas de *L. anceps* precultivadas 3 meses en AS. Los resultados son el promedio de 20 repeticiones por tratamiento, \pm e.s. Las barras con la misma letra son estadísticamente iguales. Diferencia estadística (Tukey, $p < 0.05$).

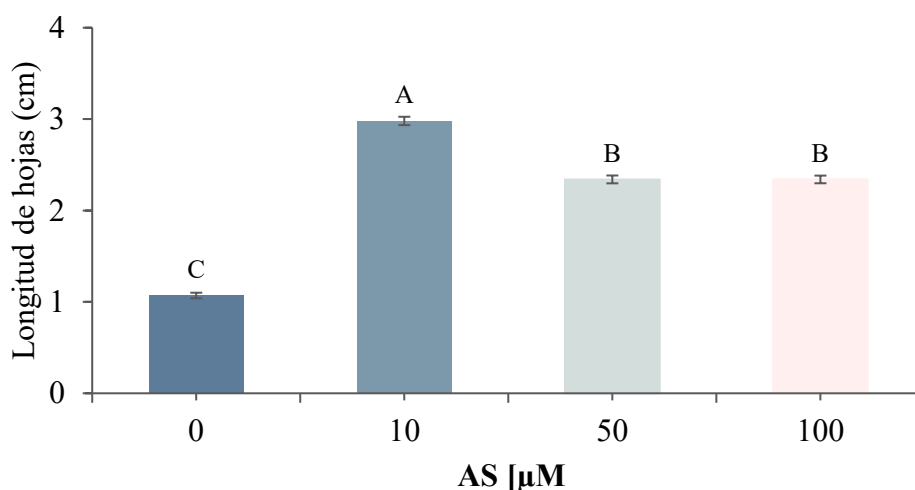


Figura 13. Longitud de hojas de microplantas de *L. anceps* precultivadas 3 meses en AS. Los resultados son el promedio de 20 repeticiones por tratamiento, \pm e.s. Las barras con la misma letra son estadísticamente iguales. Diferencia estadística (Tukey, $p < 0.05$).

Número de raíces y de hojas

En las microplantas de *L. anceps* precultivadas en AS, se observó una tendencia a la inhibición en el número de raíces. Con el tratamiento 10 μM se inhibió un 12.64 %, en 50 μM un 7.61 % y en 100 μM hasta un 13.19 %, comparado con el testigo (Fig. 19). En el número de hojas se observó una inhibición significativa; a una concentración de 10 μM se presentó una disminución del 7.2 %, en 50 μM un 16.8 % y en 100 μM hasta un 31.12 %, respecto al testigo (Fig. 20).

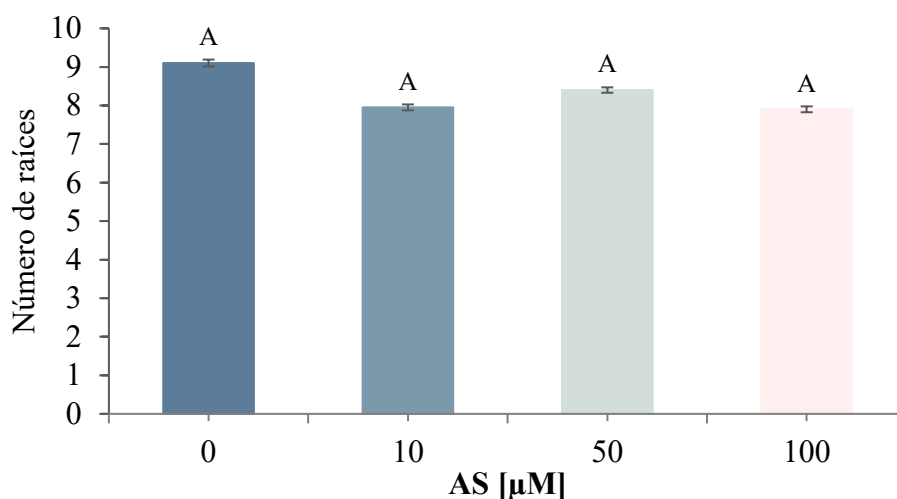


Figura 14. Número de raíces de microplantas de *L. anceps* precultivadas 3 meses en AS. Los resultados son el promedio de 20 repeticiones por tratamiento, \pm e.s. Las barras con la misma letra son estadísticamente iguales. Diferencia estadística (Tukey, $p < 0.05$).

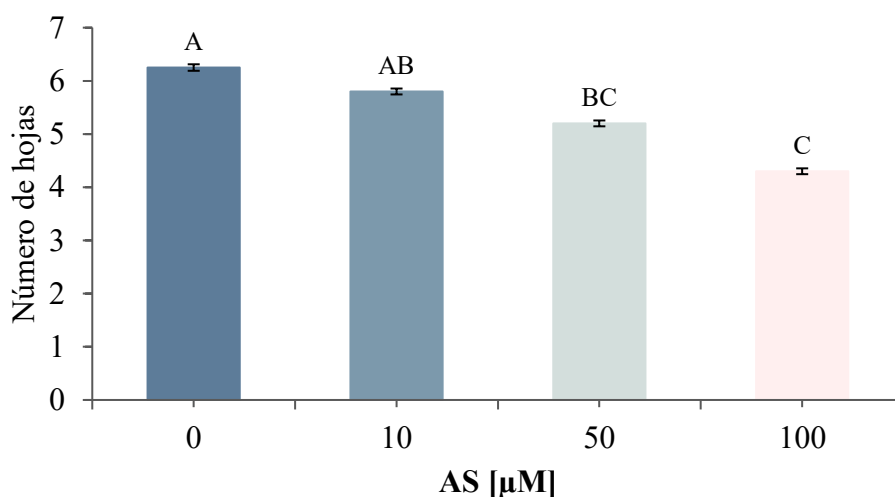


Figura 15. Número de hojas de microplantas de *L. anceps* precultivadas 3 meses en AS. Los resultados son el promedio de 20 repeticiones por tratamiento, \pm e.s. Las barras con la misma letra son estadísticamente iguales. Diferencia estadística (Tukey, $p < 0.05$).

Peso fresco

En las microplantas de *L. anceps* precultivadas en AS, el peso fresco se inhibió significativamente. En la concentración de 10 μM se redujo un 23.8 %, en 50 μM un 58.15 % y 100 μM hasta un 29.45 %, con respecto al testigo (Fig. 21).

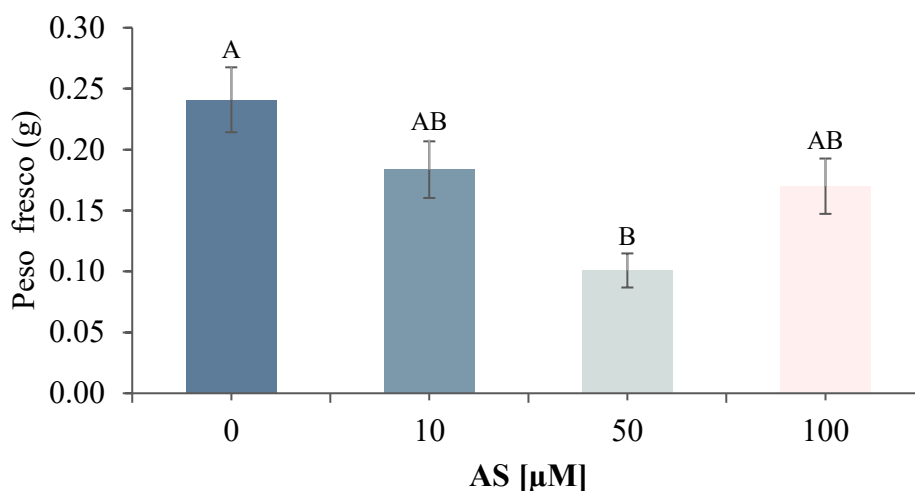


Figura 16. Peso fresco de microplantas de *L. anceps* precultivadas 3 meses en AS. Los resultados son el promedio de 20 repeticiones por tratamiento, \pm e.s. Las barras con la misma letra son estadísticamente iguales. Diferencia estadística (Tukey, $p < 0.05$).

7.2. Supervivencia *ex vitro* de microplantas precultivadas en ácido salicílico de *G. aurantiaca* y *L. anceps*

7.2.1 *Guarjanthe arautiaca*

En todos los tratamientos con AS, la supervivencia se redujo; en el caso de la dosis 50 μM la disminución fue de 8.34 %, con 10 y 100 μM hasta en 16.67 %, en comparación al testigo (Tabla 8, Fig. 23 y 24).

Tabla 8. Supervivencia *ex vitro* de microplantas de *G. arautiaca* precultivadas en AS durante 3 meses.

Tratamiento	Concentración de AS	Sobrevivencia <i>ex vitro</i> (%)*
T0	0 μM	92.30
T1	10 μM	76.92
T2	50 μM	84.61
T3	100 μM	76.92

*Los resultados son el porcentaje de supervivencia con respecto a las 27 vitroplantas por tratamiento precultivadas en AS.

7.2.2 *Laelia anceps*

La supervivencia incrementó en los tratamientos con AS de 10 y 100 μM hasta un 18.17 % y 9.08 %, con respecto al testigo (Tabla 9, Fig. 25 y 26), mientras que en el tratamiento 50 μM de AS disminuyó 13.63 %.

Tabla 9. Supervivencia *ex vitro* de microplantas de *L. anceps* precultivadas en AS durante 3 meses.

Tratamiento	Concentración de AS	Sobrevivencia <i>ex vitro</i> (%)*
T0	0 μM	81.48
T1	10 μM	96.29
T2	50 μM	70.37
T3	100 μM	88.88

*Los resultados son el porcentaje de la supervivencia con respecto a las 27 microplantas por tratamiento cultivadas en AS.

8. DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos, se considera que el desarrollo *in vitro* de *G. arauntiacca* es muy lento, ya que después de 23 meses de varios subcultivos (Fig. 8) solo alcanzó una altura promedio de 1.29 cm. Además, se observó oxidación en las primeras hojas desde el trasplante en AS, incluido el tratamiento testigo (Fig. 16 y 24). Esto podría explicar por qué no se observan diferencias significativas ($p < 0.05$), aunque sí hay tendencias crecientes en algunas variables evaluadas, con respecto al testigo (Tablas 6 y 8, Fig. 11, 12, 13, 14 y 15).

Esta es una respuesta poco usual en el cultivo de tejidos vegetales, ya que al realizar múltiples trasplantes a medio nuevo se proporciona espacio, nutrientes y humedad para que las microplantas continúen su desarrollo adecuadamente evitando competencia y falta de nutrientes y humedad; además, en cada trasplante se elimina tejido necrosado, lo que estimula aún más el desarrollo (García *et al.*, 2012). En el caso de *G. arauntiacca*, se realizaron cuatro trasplantes en cada una de las etapas de desarrollo, utilizando medios suplementados con nutrientes, vitaminas y hormonas. Sin embargo, el crecimiento y desarrollo fueron lentos. Este resultado coincide con los reportados por de López-Selva (2018), quien observó un crecimiento lento en esta especie al emplear medio MS (Murashige y Skoog) y MS suplementado con hormonas; el autor también reporta que las hojas se marchitaron. *Barkeria skinneri* es otra especie en la que se ha observado crecimiento muy lento, en la que después de 18 meses de cultivo desde la germinación creció máximo dos centímetros (López-Selva, 2018).

En general, la mayoría de las investigaciones orientadas hacia la generación de protocolos en el cultivo *in vitro* en orquídeas, han demostrado que es una alternativa eficaz para la multiplicación y desarrollo de diferentes especies en un tiempo relativamente corto (Moreno-Bermúdez *et al.*, 2021; Santiago-Jerónimo *et al.*, 2024; Ramírez-Mosqueda y Cruz-Cruz, 2024; Mora-Herrera *et al.*, 2025). Sin embargo, como se evidencia en esta investigación, después de 23 meses en cultivo *in vitro* *G. aruntiaca* el crecimiento fue lento. Esto confirma que, mediante la biotecnología para la conservación de especies de orquídeas es necesario implementar protocolos específicos para cada especie debido a que los requerimientos de cada una pueden variar.

Los resultados obtenidos con *G. aruntiaca* son muy contrastantes con los encontrados en las microplantas de *L. anceps*, en la que sin subcultivos frecuentes las microplantas crecieron hasta 4.76 cm y, además, en el precultivo con AS se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en las variables de longitud de raíces y de hojas, número de hojas y peso fresco, destacando que estas microplantas desarrollaron hasta 3.99 cm en la longitud de hojas (Fig. 18), a diferencia de *G. aruntiaca* que solo alcanzó en promedio 1.0 cm de longitud (Fig. 12), lo cual demuestra la respuesta diferencial entre las especies y a los tratamientos con AS.

En este trabajo los tratamientos con AS no fueron letales para las dos especies evaluadas, como también lo reportaron Olivares-Aguilar (2021) y Mora-Herrera *et al.* (2025) para *L. autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp.; los autores que también emplearon hasta 100 μM de AS, entre sus resultados destaca que concentraciones bajas de AS 1 y 10 μM favorecieron el crecimiento y la supervivencia. En otra especie de orquídea *Dendrobium officinale* el AS aumentó el contenido de polisacáridos a una concentración de 100 μM (Yuan *et al.*, 2014). En ninguno de los estudios anteriores se reportaron efectos adversos por el AS, inclusive en concentraciones más altas de 100 μM en *Epidendrum* sp. (Mora-Herrera *et al.*, 2019).

En otros trabajos, Mantovani (2020) evaluó concentraciones de AS considerablemente altas como 400, 500 y 1000 μM , en dos especies de orquídeas epífitas *Cymbidium atropurpureo* y *Phanellaenopsis* 'Golden Poker' en condiciones *in vitro*. El autor reporta que el AS redujo el número de hojas y de raíces, longitud de raíces, la masa seca y el área foliar; además, incrementó la fuga de electrolitos, lo que consecuentemente indujo toxicidad en ambas especies. No obstante, *C. atropurpureo* mostró mayor tolerancia al AS en comparación con *Phanellaenopsis* 'Golden Poker', este último resultado coincide

con lo obtenido en este trabajo, siendo la especie *G. arauntiacca* más sensible al AS que *L. anceps*.

Se han estudiado concentraciones aún más altas por García-Vara (2025; datos no publicados) para conservación en bancos de germoplasma, en microplantas de *Epidendrum* sp. precultivadas en AS durante 465 días con dosis de 1000 y 5000 μM . La autora reporta que el AS inhibió la longitud de tallos y raíces hasta 71.35 % y 90.44 %; no obstante, pese a que son dosis muy altas el AS no fue letal. Esto comprueba que algunas especies de orquídeas pueden tolerar concentraciones muy altas de AS, considerando que algunas investigaciones han revelado que el AS es capaz de inducir respuestas fisiológicas a concentraciones extremadamente bajas en el intervalo femtomolar (0.1 fM) y picomolar (100 pM), concentraciones que en *Catharanthus roseus* promovieron el crecimiento radicular (Echevarría-Machado *et al.*, 2007).

Una respuesta no esperada en *L. anceps* es que forma brotes de *novo* y estos se incrementaron en las microplantas cultivadas en AS y, aunque esta variable no fue cuantificada en esta investigación, dicha respuesta es muy importante en la generación de protocolos para la propagación (Fig. 26). La inducción de organogénesis mediada por salicilatos ha sido previamente reportada en microplantas de papa (Mora-Herrera, y López-Delgado, 2012) así como en otras especies de orquídeas, como *Epidendrum* sp. (García-Vara 2025; datos no publicados). No obstante, dicha respuesta no se presentó en *G. aurantiaca* bajo las mismas condiciones experimentales.

En general, el crecimiento de microplantas de orquídeas precultivadas en AS, al establecerse en condiciones *in vitro* y *ex vitro*, tuvo una respuesta diferencial dependiente de la especie y de la concentración de AS en la que fueron precultivadas.

En las microplantas de *G. arauntiacca* preincubadas en AS y después aclimatadas en invernadero, se observó una disminución en la supervivencia *ex vitro*, con respecto al testigo. Por el contrario, en microplantas de *L. anceps* se observó un incremento en la supervivencia *ex vitro*, especialmente en las precultivadas con 10 y 100 μM de AS, con respecto al testigo (Fig. 9). Este último resultado, se relaciona con los de Mora-Herrera *et al.* (2025), quienes reportaron que en microplantas de *L. autumnalis*, *Epidendrum* sp. y *Encyclia* sp., precultivadas con 10 μM de AS, incrementaron significativamente la supervivencia con respecto al testigo. Este comportamiento también se ha identificado en *Epidendrum* sp. con un 93.3 % de supervivencia con 10 μM (García-Vara, 2025; datos no publicados).

De acuerdo con lo anterior, es claro entonces que se deben implementar protocolos especiales para orquídeas como *G. arauntiaca*, ya que esta especie es más vulnerable por su lento desarrollo.

9. CONCLUSIONES

- El crecimiento y desarrollo en condiciones *in vitro* presentó una respuesta diferencial entre las dos especies evaluadas; en *Laelia anceps* el desarrollo fue hasta 3 veces mayor y en menor tiempo, en contraste con el de *G. aurantiaca*.
- Los pretratamientos con AS a 10 y 100 μM incrementaron la supervivencia en condiciones *ex vitro* en microplantas de *L. anceps*.
- El precultivo con 10 μM AS es potencialmente útil para la aclimatación *ex vitro* en *L. anceps*.

10. PERSPECTIVAS

En la micropropagación de orquídeas, una de las etapas más críticas e importantes es la aclimatación a condiciones *ex vitro*. En este sentido, los resultados obtenidos en esta investigación generaron información básica para complementar los protocolos del cultivo *in vitro* en las especies evaluadas, los cuales también pueden ser aprovechados para la conservación y/o la comercialización legal.

Como se reporta en esta investigación, las respuestas fisiológicas de las orquídeas en la micropropagación son muy diversas, por lo que es necesario continuar con más estudios enfocados en conocer y optimizar los mecanismos del AS para la inducción de tolerancia al estrés en cada especie, considerando las siguientes líneas de investigación específicas:

- Desarrollar protocolos de cultivo *in vitro* adaptados a las características fisiológicas de *G. aurantiaca*, incluyendo la evaluación de distintos medios de cultivo con diferentes nutrientes, hormonas o inclusive antioxidantes.
- Evaluar concentraciones significativamente más bajas de AS en *G. arauntiaca*.
- Cuantificar la formación de brotes inducidos por el AS en *L. anceps*.
- Realizar investigaciones comparativas entre diferentes géneros de orquídeas para identificar patrones comunes y específicos como respuesta al AS.
- Ampliar los estudios de aclimatación, enfocándose en la adaptación fisiológica y morfológica de las microplantas tratadas con AS.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, S.D.N., y Antezana, V.N.E. (2020). Aplicaciones de la biotecnología vegetal para la micropropagación de cactáceas. [Tesis para el título de Ingeniero Agrónomo]. <http://sb.uta.cl/CargadorTesis/TesisDigitalesARI/79340-Aguilera%20Daniel.pdf>
- Alghamdi, S.A. (2019). Influencia de los hongos micorrízicos en la germinación y el crecimiento de semillas en orquídeas terrestres y epífitas. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(3): 495-502. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X1730270X>
- Archila, F., Chiron, G., Szlachetko, D., Bertolini, V., y Pérez-García, E. (2014). *Laelia mottae* (Orchidaceae): Una especie nueva del complejo de *Laelia anceps* Lindl. *Botanical Sciences*, 92(3): 343-350.
- Bag, N., Palni, L.M.S., y Nandi, S.K. (2019). Un método eficiente para la aclimatación. *Current Science*, 117 (2), 288-293.
- Banerjee, S.N.T.M.N. (2013). Asymbiotic seed germination and seedling development of *Vanda testacea* (Lindl.) Reichb. f.: An *in vitro* approach for optimization of cultural requirements for a medicinally important rare orchid. *International Journal of Current Research*, 5(4): 6. <http://www.journalcra.com>
- Batista, V.C.V., Pereira, I.M.C., Paula-Marinho, S.O., Canuto, K.M., Pereira, R.C.A., Rodrigues, T.H.S., Daloso, D.M., Gomes, F.E., Carvalho, H.H. (2019). Salicylic acid modulates primary and volatile metabolites to alleviate salt stress-induced photosynthesis impairment on medicinal plant *Egletes viscosa*. *Environmental and Experimental Botany*, 167: 103870. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2019.103870>
- Bello-Bello, J.J., y Spinoso-Castillo, J.L. (2023). Utilización de nanopartículas de plata en la micropropagación de plantas. *Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología*, 16(30).
- Bello-Castañeda, N., Coy-Barrera C., y Pérez M. M. (2023). Revisión sistemática sobre tipos de sustratos utilizados en la propagación de orquídeas bajo invernadero. *Mutis*, 13(1): 1-18. <https://doi.org/10.21789/22561498>
- Burgos, M.J.A. (2024). Efectos del ácido salicílico en la tolerancia de cultivos a factores abióticos de estrés. [Trabajo de titulación, Universidad Técnica de Babahoyo].

<https://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/16156/E-UTB-FACIAG-%20AGROP-000123.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Ceballos-Vásquez, E.S. (2023). 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]. <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/139062/TESIS%2c%20Stephanie%20Elizabeth%20Ceballos%20Vasquez.%20IAF..pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Chandra, S., Bandopadhyay R., Kumar V., y Chandra R. (2010). Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology letters*, 32:1199-1205. 10.1007/s10529-010-0290-0
- Chavez-Cruz, I.L., Enríquez-del Valle J.R., Hernández-Santiago E., y Rodríguez-Ortiz G. (2022). Sales minerales y reguladores de crecimiento en medios de cultivo para desarrollo de *Myrmecophila grandiflora*. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 9, 108-116.
- CONABIO [Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad]. (2022). ¿Cuántas especies hay? Disponible en línea: <https://www.biodiversidad.gob.mx/especies/cuantasesp> Consultado: 11 de mayo del 2024.
- CONAP. (2019). La Primavera celebra 39 años como Área Natural Protegida. <https://www.gob.mx/conanp/articulos/la-primavera-celebra-39-anos-como-area-natural-protogada#:~:text=El%20%20C3%81rea%20de%20Protecci%C3%B3n%20de,es%20su%2039%C2%B0%20Aniversario!&text=Esta%20%20C3%81rea%20Natural%20Protegida%20se,Contesta%20nuestra%20encuesta%20de%20satisfacci%C3%B3n>.
- Cox-Tamay, L.D. (2014). Uso de pseudobulbos de orquídeas para la elaboración de mucílago. *Boletín de la Asociación Mexicana de Orquideología*, 4-9.
- Cox-Tamay, L.D., Ruiz, J. y Pérez, E.A. (2020). Diversidad y uso de las orquídeas. *Revista Bioagrobiencias*, 9(1): 1-5.
- Crespo, G.C. (2022). ¿Qué es la biodiversidad y por qué es tan importante frenar su pérdida? National Geographic. <https://www.nationalgeographic.es/medio-ambiente/que-es-la-biodiversidad>

- De la Cruz, V. (2025). *Calaverita*. <https://mexico.inaturalist.org/taxa/204984-Laelia-anceps>
- De Menezes, G.L., Machado, M.F.P.S., Ballesta, P., Mora F., Milaneze, G.M.A., y Aparecida, M.C. (2016). Suplementos orgánicos para el cultivo *in vitro* del híbrido *Laeliocattleya* (Orchidaceae). *IDESIA*, 34(1):47-54. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292016000100006>
- Deb, C.R., y Imcen, T. (2010). An efficient *In vitro* hardening tech of tissue culture raised plants. *Biotechnol*, 1–5.
- Domínguez, Z.N. (2013). Efecto de extractos de origen fúngico en la germinación asimbiótica *in vitro* de *Guarianthe arauntiacae* (Bateman ex Lindl.) Dressler et W. E Higgins y *Euchile mariae* (Ames) Withner x *Euchile citrina* (La Llave et Lexarza) Withner (Orchidaceae). [Tesis para obtener el título de Bióloga, Universidad Nacional Autónoma de México].
- Dressler, R.L., y Higgins, W.E. (2003). *Guarianthe*, a generic name for the “*Cattleya*” *skinneri* complex. *Lankesteriana: International Journal on Orchidology*, 7(2): 37–38.
- Dzib-Ek, G., Villanueva-Couoh, E., Garruña-Hernández, R., Vergara Yoisura, S., y Larqué-Saavedra, A. (2021). Efecto del ácido salicílico en la germinación y crecimiento radicular del tomate. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 12(4): 735-740.
- Echevarría-Machado, I., Escobedo-GM, R.M., y Larqué-Saavedra, A. (2007). Responses of transformed *Catharanthus roseus* roots to femtomolar concentrations of salicylic acid. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(6-7): 501-507. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.04.003>
- Emeterio-Lara, A., Palma-Linares, V., Vázquez-García, L.M., y Mejía-Carranza, J. (2016). Usos y comercialización de orquídeas silvestres en la región sur del Estado de México. *Polibotánica*, (42): 197-214.
- Esparza, A.M.J. (2020). Introducción al cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. <https://www.fps.org.mx/portal/index.php/agrobiotecnologia/2067-introduccion-al-cultivo-in-vitro-de-tejidos-vegetales>
- Espinosa, D., S. Ocegueda, et al. (2008). El conocimiento biogeográfico de las especies y su regionalización natural, en Capital Natural de México, Volumen I: *Conocimiento actual de la biodiversidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México*, pp. 33-65.

- Espinoza, N.O., Estrada, R., Silva-Rodriguez, D., Tovar, P., Lizarraga, R., y Dodds, J.H. (1986). The potato: a model crop plant for tissue culture. *Outlook on Agriculture*, 15(1): 21-26.
- Flores, I.E.L., y Sánchez, C.D. (2018). Las orquídeas del Estado de México. *UNIVERSITARIA*, 2(8): 28-29. <https://revistauniversitaria.uaemex.mx/article/view/11549>
- Gómez M.O.E. *et al.* (2017). Conservación y aprovechamiento sostenible de especies ornamentales nativas de México. Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas y Universidad Autónoma Chapingo. México. 152.
- García, S.R., Atanasio, S.Y., Leonides, E.P., Vargas, T.V.M., Pineda, P.B. (2012). Subcultivo siembra de material ya establecido *in vitro*. Instituto Tecnológico De Ciudad Altamirano. https://yactivany.blogspot.com/2012/04/practica-n4-subcultivo-siembra-de.html?utm_source=chatgpt.com
- Gupta, N., Jain, V., Joseph, M.R., y Devi, S. (2020). A review on micropropagation culture method. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 8(1): 86-93.
- Hágsater, M. Soto, G. Salazar, R. Jiménez, M. López., y R. Dressler. (2005). Las Orquídeas de México, Instituto Chinoín y Redacta, México. https://inecol.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1005/165/1/963_2011-10326.pdf
- Hazarika, B. N., Teixeira da Silva, J. A., y Talukdar, A. (2006). Effective acclimatization of *in vitro* cultured plants: methods, physiology and genetics. *Floriculture ornamental and plant biotechnology*, 2: 427-438.
- Horváth, E., Szalai, G., y Janda, T. (2007). Inducción de tolerancia al estrés abiótico mediante señalización de ácido salicílico. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26: 290-300.
- iNaturalist. (s.f.). *Guarianthe aurantiaca: observaciones e imágenes*. https://mexico.inaturalist.org/taxa/284255-Guarianthe-aurantiaca/browse_photos (Fecha de consulta: 05 de noviembre de 2024)
- iNaturalist. (s.f.). *Laelia anceps: Observaciones e imágenes*. https://www.inaturalist.org/taxa/204984-Laelia-anceps/browse_photos (Fecha de consulta: 05 de noviembre de 2024)
- Irsyadi, M. B. (2021). Factors That Effect of the Optimal Plantlet Growth from Tissue Culture on the Acclimatization Stage. *Proceeding International Conference on*

- Khan, M.I.R., Fatma, M., Per, T.S., Anjum, N.A., y Khan, N.A. (2015). Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Frontiers in plant science*, 6: 462.
- Kumar, K. & Rao, I.U. (2012). Morphophysiological problems in acclimatization of micropropagated plants in *ex vitro* conditions—a review. *Journal of Ornamental Horticulture and Plants*, 2(4): 271–283
- Lando, A. P., Wolfart, M.R., Fermino Jr, P.C.P., y Santos, M. (2016). Structural effects on *Cattleya xanthina* leaves cultivated *in vitro* and acclimatized *ex vitro*. *Biologia Plantarum*, 60(2): 219-225. <https://bp.ueb.cas.cz/pdfs/bpl/2016/02/02.pdf>
- Larqué-Saavedra, A., Martín-Mex, R., Nexticapan-Garcéz, Á., Vergara-Yoisura, S., y Gutiérrez-Rendón, M. (2010). Efecto del ácido salicílico en el crecimiento de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 16(3):183-187.
- Lavanya, M., Venkateshwarlu, B., y Devi, B.P. (2009). Acclimatization of neem microshoots adaptable to semi-sterile conditions. *Indian J Biotechnol*, 8:218–222. <https://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/3894>
- Lee-Espinosa, H.E., Laguna-Cerda, A., Murguía González, J., Iglesias-Andreu, L., García-Rosas, B., Escobedo-López, D., y Santana-Buzzy, 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.
- López-Selva, M.M. (2018). Protocolo cultivo *in vitro* de orquídeas con distribución en Guatemala. Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente (IARNA). <https://www.url.edu.gt/publicacionesurl/pPublicacion.aspx?pb=1089>
- Luna-Rosales, B.S., Barba-Álvarez, A., Romero-Tirado, R., Pérez-Toledano, E., Perea-Morales, O., Padrón-Hernández, S., y Jardón-Sánchez, D. (2007). Diversidad de orquídeas en el “Parque Nacional Iztaccihuatl-Popocatepetl” (México) y sus áreas de influencia. *Lankesteriana International Journal on Orchidology*, 7(1-2): 56-59.
- Maharjan, S., Thakuri, L.S., Thapa, B.B., Pradhan, S., Pant, K.K., Joshi, G.P., y Pant, B. (2020). *In vitro* propagation of the endangered orchid *Dendrobium chryseum* Rolfe from protocorms culture. *Nepal Journal of Science and Technology (NJST)*, 19(1): 39-47.

- Mala, B., Kuegkong, K., Sa-Ngiaemsri, N., y Nontachaiyapoom, S. (2017). Efecto de los medios de germinación sobre la germinación simbiótica de semillas *in vitro* de tres orquídeas *Dendrobium*. *Revista Sudafricana de Botánica*, 112: 521-526.
- Mantovani, C. (2020). Avaliação do ácido salicílico exógeno e fontes e doses de silício no cultivo *in vitro* e na aclimatização de orquídeas epífitas. [Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia]. <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/dc694966-342e-420d-a2bd-fa2f28442461/content>
- Martín-Mex, R., Nexticapan-Garcéz, Á., Villanueva-Couoh, E., Uicab-Quijano, V., Vergara-Yoisura, S., y Larqué-Saavedra, A. (2015). Salicylic acid stimulates flowering in micropopagated gloxinia plants. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 38(2), 115-118. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-73802015000200001&script=sci_arttext
- Menchaca-García, R.A., y Moreno, D.M. (2011). Conservación de orquídeas una tarea de todos. Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México, 41 p.
- Mencias-Méndez, H.F., y Salazar-Ponce, T.F. (2018). Estudio fitoquímico, actividad antioxidante de especies de orquídeas de los géneros *Epidendrum*, *Oncidium* y *Caucaea*. Ingeniería En Biotecnología De Los Recursos Naturales. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito.
- Méndez-Cárdenas, M.G., Rivera-Rebolledo, J.A., Bernal-Stoopen, J.F., Montijo-Arreguín, C.M., y Vega-Rosales, M.B. (2016). Estrategias de conservación de la biodiversidad. En: La biodiversidad en la Ciudad de México, vol. iii. conabio/sedema, México, pp.279-284. <https://www.cbd.int/doc/nbsap/study/mx-study-cuidad-de-mexico-p3-es.pdf>
- Miura, K., y Tada, Y. (2014). Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Frontiers In Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00004>
- 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., Olivares-Aguilar, J.M., García-Vara, A, García-Velasco, R., y Mejía-Carranza, J. (2019). Cultivo *in vitro* empleando ácido salicílico para el

- desarrollo y conservación de orquídeas. Reuniones Nacionales de Investigación e Innovación Pecuaria, Agrícola, Forestal y Acuícola Pesquera, Chiapas.
- Mora-Herrera, M.E., Olivares-Aguilar, J.M., Reyes-Araujo, D.Y., Ceballos-Vásquez, S. E., y García-Velasco, R. (2025). Evaluation of salicylic acid in the *Laelia autumnalis* (Lex.) Lind., *Epidendrum* sp. AND *Encyclia* sp. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 28(1).
- Mora-Herrera, M.E., y López-Delgado, H.A. (2006). Tolerancia a baja temperatura inducida por ácido salicílico y peróxido de hidrógeno en microplantas de papa. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29(2): 81-85.
- Mora-Herrera, M.E., y López-Delgado, H.A. (2012). Inducción de organogénesis en microplantas de papa (*Solanum tuberosum* L.). XXV Congreso de la Asociación Latinoamericana de la papa.
- Moreno-Bermúdez, L.J., García, L.R., La, M., Padrón, Y., Hernández-Pérez, M. M., Fernández, Y., y Posada-Pérez, L. (2021). Protocolo para la propagación *in vitro* de *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg. a partir de semilla botánica. *Biotechnología Vegetal*, 21(3).
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497
- Murdad, R., Latip, M., Aziz, Z., y Ripin, R. (2010). Effects of carbon source and potato homogenate on *in vitro* growth and development of Sabah's Endangered orchid: *Phalaenopsis gigantean*. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 18(1): 199-202
- Nabieva, A.Y. (2021). Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Orchis militaris*, an endangered orchid in Siberia. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1):122.
- Nájar, A. (2011). México pierde a sus orquídeas. BBC Mundo, Ciudad de México. Consultado el 20 de noviembre de 2019. http://www.bbc.com/mundo/noticias/2011/10/111006_orquidea_mexico_extincion_an.shtml#page-to
- 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. [Tesis para obtener el título de Ingeniero Agrónomo en Floricultura, Centro Universitario UAEM Tenancingo Tenancingo]. Repositorio institucional UAEMEX. <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/110584>

- Oliveira, L.S, Dias, P.C., y Brondani. G.E. (2013). Micropropagación de especies forestales brasileiras. *Pesquisa florestal brasileira*, 33(76): 439-453.
- Piña-Torres, I. H. (2021). Orquídeas: Un mundo más allá de plantas ornamentales. *Clubes de Ciencia México*. <https://www.clubesdeciencia.mx/orquideas>
- Pisanty, I., Urquiza-Haas, E, Vargas-Mena, A., y Amezcua. (2016). Instrumentos de conservación *in situ* en México: logros y retos, en Capital natural de México, vol. iv: *Capacidades humanas e institucionales*. CONABIO, México, pp. 245-302.
- Plascencia, R.L., Castañon-Barrientos, A., y Raz-Guzmán, A. (2011). La biodiversidad en México: su conservación y las colecciones biológicas. *Ciencias*, 101, 36-43. <https://www.redalyc.org/pdf/644/64419046005.pdf>
- PROFEPA. [Procuraduría Federal de Protección al Ambiente]. (2020). Acciones de Profepa contra el comercio ilegal de Orquídeas. Disponible en línea: <https://www.gob.mx/profepa/articulos/acciones-de-profepa-contra-el-comercio-ilegal-de-orquideas#:~:text=Un%20total%20de%20190%20especies,%2D059%2DSEMA%2D2010.&text=Las%20principales%20amenazas%20que%20enfrentan,extracci%C3%B3n%20ilegal%20con%20fines%20comerciales> Consultado: 25 de Enero del 2024
- PROFEPA. [Procuraduría Federal de Protección al Ambiente]. (2022). Riqueza de la flora de México Las Orquídeas. Disponible en línea: <https://www.gob.mx/profepa/articulos/riqueza-de-la-flora-de-mexico-las-orquideas#:~:text=M%C3%A9xico%20Las%20Orqu%C3%ADdeas-.Las%20orqu%C3%ADdeas%20constituyen%20uno%20de%20los%20grupos%20de%20plantas%20más,se%20encuentran%20en%20nuestro%20pa%C3%ADs> Consultado: 25 de Enero del 2024
- Ramírez, M.M.A. (2024). Micropropagación comercial (Etapas: 0, I, II, III, IV). [Diapositivas de PowerPoint]. El Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).
- Ramírez-Mosqueda, M.A., y Cruz-Cruz, C.A. (2024). *Micropropagation Methods in Temporary Immersion Systems*. Humana Press.
- Ramos-Bell, S., Diaz-Cayetano, G., Hernández-Montiel, L.G., Velázquez-Estrada, R. M., Montalvo-González, E., y Gutiérrez-Martínez, P. (2024). Conservación

- fisicoquímica de arándanos tratados con quitosano y ácido salicílico en poscosecha. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 15(5): 33-91.
- Ratia, J. (2024). Estos son los países más megadiversos de la Tierra. <https://red2030.com/estos-son-los-paises-mas-megadiversos-de-la-tierra/#:~:text=Los%20elegidos%20fueron%20Brasil%2C%20Colombia,Democr%C3%A1tica%20del%20Congo%20y%20Sud%C3%A1frica>.
- Rocha, G.E.O. (2016). Género *Guarianthe*. https://prezi.com/j_sk0nkudehz/genero-guarianthe/
- Rocha, G.E.O. (2018). Unidades de manejo para la conservación de la vida silvestre con enfoque en orquídeas (Orchidaceae). *Agro Productividad*, 10(6). <https://www.revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/1040>
- Rocha, G.E.O. (2023). *Laelia anceps*. Asociación Mexicana de Orquideología [AMO]. <https://amo.com.mx/galerias/Mexicanas/slides/Laelia%20anceps.html>
- Rodríguez-Aguilar, S. P., Muñoz-Olvera, A., Durán-Flores, R., Hernández-Feregrino, J., Limón-Medrano, J.P., y Hernández-Hernández, H.M. (2021). Micropropagación como alternativa para evitar la extinción de plantas endémicas. *Journal of bioengineering*, 5(3): 1-15.
- SADER [Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural]. (2016). Orquídea, flor bella y milenaria. <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/orquidea-flor-bella-y-milenaria#:~:text=El%20uso%20de%20esta%20flor,el%20caso%20de%20la%20vainilla>.
- Salmerón, B.E. (2025). Género *Guarianthe*. <https://mexico.inaturalist.org/taxa/206240-Guarianthe>
- Sánchez, B.M., y Mamani, A.G.Q. (2024). Efecto de diferentes tipos de enraizadores *in vitro* y sustratos en la aclimatación de *Zigopetalum maculatum* (Orchidaceae). *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 11(2): 65-73.
- Sánchez, I.E., García-Cruz, J., Espejo-Serna, A., y López-Ortega, G. (2019). Identification of areas of endemism in the Mexican cloud forests based on the distribution of endemic epiphytic bromeliads and orchids. *Phytotaxa*, 397(2). <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.397.2.1>
- Sánchez-Chávez, E., Barrera-Tovar, R., Muñoz-Márquez, E., Ojeda-Barrios, D. L., y Anchondo-Nájera, Á. (2011). Efecto del ácido salicílico sobre biomasa, actividad

fotosintética, contenido nutricional y productividad del chile jalapeño. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 17(SPE1): 63-68.

Santiago-Jerónimo, T., Chávez-Ávila, V. M., Carballar-Hernández, S., y González-Cubas, R. (2024). Organics compounds in the *in vitro* propagation of the Mexican endemic orchid *Epidendrum falcatum* Lindl. *Polibotánica*, (57): 157-170.

Sarandón, S.J. (2020). Capítulo 1: Agrobiodiversidad, su rol en una agricultura sustentable. Biodiversidad, agroecología y agricultura sustentable (pp. 13-36). Endupl.

https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/109141/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Sarukhán, J., *et al.* (2009). Capital natural de México. Síntesis: conocimiento actual, evaluación y perspectivas de sustentabilidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.

http://centro.paot.org.mx/documentos/conabio/capital_natural.pdf

Sarukhán, J., *et al.* (2017). Capital natural de México. Síntesis: evaluación del conocimiento y tendencias de cambio, perspectivas de sustentabilidad, capacidades humanas e institucionales. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.

http://www2.biodiversidad.gob.mx/pais/pdf/CapNatMex/Sintesis_CNM_2017.pdf

Seidel-Júnior, D., y Venturieri, G. A. (2011). *Ex vitro* acclimatization of *Cattleya forbesii* and *Laelia purpurata* seedlings in a selection of substrates. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 33: 97-103.

SEMARNAT. (2012). Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave y de Desempeño Ambiental. Edición.

https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe_12/pdf/Informe_2012.pdf

SEMARNAT. [Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales]. (2010). *Norma Oficial Mexicana NOM-059- SEMARNAT-2010*. Publicada el 30 de diciembre de 2010 en el Diario Oficial de la Federación. Última reforma publicada el 14 de noviembre de 2019.

Solano, G., López, B. y Martínez, V. (2007). Listado de las orquídeas de la región de Juquila Oaxaca, México, naturaleza y desarrollo, 2 (5).

- Solano-Gómez, R., Cruz-Lustre G., Martínez-Feria A. y Lagunez-Rivera L. (2010). Plantas utilizadas en la celebración de la Semana Santa en Zaachila, Oaxaca, México. *Polibotánica*, 29: 263-279
- Tejeda-Sartorius, O. (2017). Características ornamentales de orquídeas silvestres y su propagación con fines comerciales. Alternativa de aprovechamiento sustentable *ex situ*. *Agro Productividad*, 10(6). <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/1037>
- Tejeda-Sartorius, O. (2018). Características ornamentales de orquídeas silvestres y su propagación con fines comerciales. Alternativa de aprovechamiento sustentable *ex situ*. *Agro Productividad*, 10(6). Recuperado a partir de <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/1037>
- Telléz-Velasco, M.Á.A. (2011). Diagnóstico de la familia Orchidaceae en México. Universidad Autónoma Chapingo. México. 179 p. http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/244899/Diagnostico_de_la_familia_orchidaceae_en_mexico.pdf
- Thammasiri, K., Jitsopakul, N., y Prasongsom, S. (2022). Micropropagation of some orchids and the use of cryopreservation. *Orchids Phytochemistry, Biology and Horticulture: Fundamentals and Applications*, 225–260. https://doi.org/10.1007/978-3-030-38392-3_10
- Torres, J., Laskowski, L., Sanabria, M.E. (2006). Efecto del ambiente desarrollo sobre la anatomía de la epidermis foliar de *Cattleya jenmanii* Rolfe. *Bioagro* 18: 93–99.
- Tucuch Haas, C. J., Alcántar González, G., y Larqué Saavedra, A. (2015). Efecto del ácido salicílico en el crecimiento de la raíz y biomasa total de plántulas de trigo. *Terra Latinoamericana*, 33(1): 63-68.
- Tucuch-Haas, C.J., Alcántar-González, G., Volke-Haller, V.H., Salinas-Moreno, Y., Trejo-Téllez, L.I., y Larqué-Saavedra, A. (2016). Efecto del ácido salicílico sobre el crecimiento de raíz de plántulas de maíz. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(3):709-716.
- Tucuchuc, H., Angulo, A., y Mejía, M. (2021). Uso de Aspirina® (Ácido Acetilsalicílico) en el rendimiento del grano del cultivo de maíz (en línea), 8(1). https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-33802021000100103

- UNDP. [United Nations Development Programme]. (2015). Objetivo 15 vida de ecosistemas terrestres. Disponible en línea: <https://www.undp.org/es/sustainable-development-goals/vida-ecosistemas-terrestres> Consultado: 24 de enero del 2024.
- Unigarro, C.A., Flórez, C.P., Oliveros, C.E., y Cañón, M. (2018). Efecto de cuatro inhibidores de etileno en la maduración del fruto de café (*Coffea arabica* L.) durante precosecha. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 12(2): 500-507.
- Utami, E.S.W., Purnobasuki, H., Soedarti, T., y Haryanto, S. (2015). Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Paphiopedilum liemianum* Fowlie, an endangered terrestrial orchid in Northern Sumatra, Indonesia. *Journal of Plant Sciences*, 10(1):25-34.
- Vasco-Ávila, C. A., y Gómez Gutiérrez, D. C. (2020). Evaluación del enraizamiento *in vitro* y aclimatación de plántulas de la orquídea *Epidendrum ibaguense*. *Sistema Internacional de Ciencia y Tecnología Agrícolas*. <https://agris.fao.org/search/en/providers/124652/records/669e710800eb85b7d72b216a>
- Vázquez-Díaz, D.A., Salas-Pérez, L., Preciado-Rangel, P., Segura-Castruita, M. Á., González-Fuentes, J. A., y Valenzuela-García, J. R. (2016). Effect of salicylic acid in the production and quality nutraceutical tomato fruits. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263149506002>
- Velázquez, J. Z. B. (2019). Propuesta de una estrategia de conservación de las orquídeas silvestres comercializadas en el mercado Isabel Díaz de Castilla en Tenango de las Flores, Puebla. [Doctoral dissertation, Tesis de Maestría en Ciencias del Ambiente. Universidad Veracruzana Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias]. https://www.uv.mx/pozarica/mca/files/2019/05/G06_ZUNY-BERENICE-VELAZQUEZ-JUAREZ.pdf
- Velázquez-Juárez, Z.B., Alanís-Méndez, J.L., Lozano-Rodríguez, M.A., y Raya-Cruz, B. E. (2023). Diversidad y conservación de orquídeas en Tenango de las Flores, Puebla, México, *UVserva*, (16):120-137. <https://doi.org/10.25009/uvs.vi16.2972>
- Vera, A.A., Murguía G.J., y Llarena H.R.C. (2021). Las orquídeas mexicanas: *Laelias*. *Ciencia*, 72 (1). https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/72_1/PDF/14_72_1_118_8_Orquideas-L.pdf

- Vera-Tudela, R.H.M. (2011). Optimización de protocolos para la aclimatación de plántulas de orquídeas provenientes de cultivo *in vitro*. [Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo]. Tarapoto, Perú. <https://tesis.unsm.edu.pe/bitstream/11458/3824/1/AGRONOM%c3%8dA%20-%20Henry%20Manuel%20Vera%20Tudela%20Ramirez.pdf>
- Villaseñor, R.J.L, Ortiz, B.E., y Murguía, R.M. (2023). En México convive siete por ciento de las especies de plantas vasculares del mundo. https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2023_239.html
- Yuan, Z., Cong, G., y Zhang, J. (2014). Effects of exogenous salicylic acid on polysaccharides production of *Dendrobium officinale*. *South African Journal of Botany*, 95:78-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2014.08.007>

12. ANEXOS



Figura 17. Almacigo con vitroplantas de *G. arauntiacca* en aclimatación *ex vitro*.

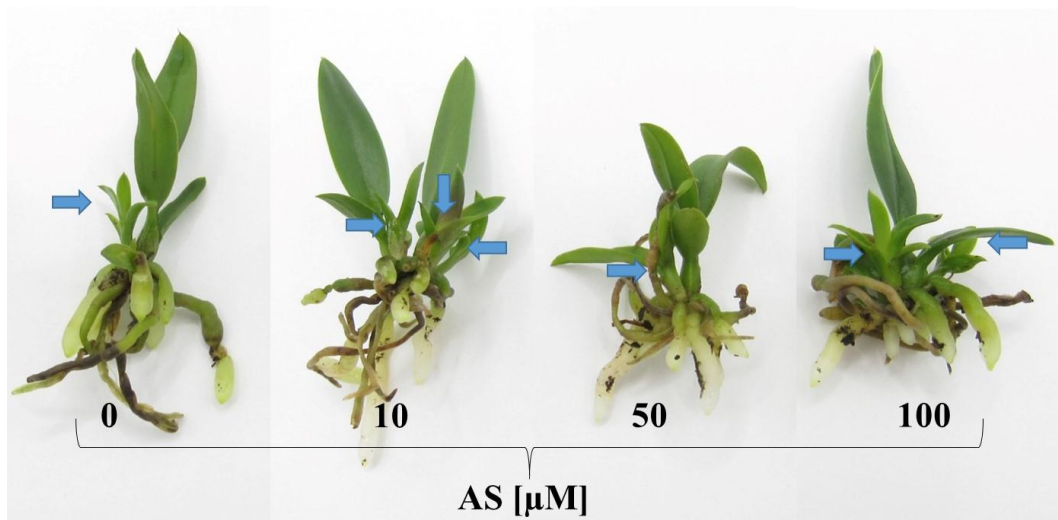


Figura 20. Vitroplantas de *L. anceps* después de la aclimatación *ex vitro*.

Nota: Las flechas indican los brotes observados en esta especie.