



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**  
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO  
EDAFOLOGÍA

**“EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA  
LA REPRODUCCIÓN *in vitro* DE *Laelia anceps*”**

**MARIANA MARGARITA SÁNCHEZ ROLDÁN**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2009

La presente tesis titulada: “**EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO EN LA REPRODUCCIÓN *in vitro* DE *Laelia anceps***”, realizada por la alumna: Mariana Margarita Sánchez Roldán bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS  
EDAFOLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERA: \_\_\_\_\_  
DRA. LIBIA IRIS TREJO-TÉLLEZ

ASESOR: \_\_\_\_\_  
DRA. ALEJANDRINA ROBLEDO PAZ

ASESOR: \_\_\_\_\_  
DR. FERNANDO C. GÓMEZ MERINO

**Montecillo, Texcoco, Edo. de México, 2009**

# **EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO EN LA REPRODUCCIÓN *in vitro* DE *Laelia anceps***

**Mariana Margarita Sánchez Roldán, M. C.**

**Colegio de Postgraduados, 2009**

## **RESUMEN**

En la presente investigación se probó la viabilidad del uso de medios líquidos con ayuda de soporte físico en la reproducción *in vitro* de *Laelia anceps*, orquídea endémica de México. Los medios de cultivo líquido fueron: medio MS, solución de Steiner, fibra de coco y Promix. Los frascos contenían o 25 mL de medio líquido (MS o solución de Steiner) o 20 g de sustrato (fibra de coco o Promix) y 5 mL de agua desionizada. Cada frasco contenía un brote vegetativo de *L. anceps* y se tuvieron 45 repeticiones por tratamiento en un periodo de evaluación de 60 días. Se midió porcentaje de contaminación, calidad y crecimiento de explantes. Veinte días después de aplicados los tratamientos MS y solución de Steiner las plantas de *L. anceps* fenecieron como consecuencia de una hiperhidratación. Por el contrario, los tratamientos que incluyeron fibra de coco y Promix permitieron que las plantas duraran la totalidad del periodo experimental (60 días); el único problema en estos dos últimos medios fue la presencia de hongos que contaminaron un 35% de los explantes, y ambos medios fueron igualmente eficientes en la promoción del crecimiento de plántulas. Por otra parte, la acumulación nutrimental en el follaje de los explantes fue mayor en el medio conteniendo Promix.

# **EVALUATION OF CULTURE MEDIA FOR *in vitro* REPRODUCTION OF *Laelia anceps***

**Mariana Margarita Sánchez Roldán, M. C.**

**Colegio de Postgraduados, 2009**

## **ABSTRACT**

In this research we tested the viability of using liquid media and support material on the *in vitro* reproduction of de *Laelia anceps*, and orchidea endemic for Mexico. Liquid media tested were: MS medium, Steiner solution, coconut fiber and Promix. Flasks contained either 25 mL of liquid media (MS or Steiner solution) or 20 g substrate (coconut fiber or Promix) and 5 mL distillate water. Each flask contained a vegetative bud of *L. anceps* with 45 replications per treatment during a period of treatment of 60 days. Percentage of contamination, quality and explants growth were measured. Twenty days after application of MS and Steiners solution treatments *L. anceps* died due to a hyperhidratation. Conversely, treatments including support materials such as coconut fiber and Promix allowed plants to last until the end of the experiment (60 days); the only one problem of these two support materials was the presence of fungi that contaminated 35% of explants, and both media were equally efficient and promoting explants growth. On the other hand, nutrimental accumulation in leaves tissues was higher in Promix containing media.

## DEDICATORIAS

Dedico mi esfuerzo y trabajo a Dios, fuerza impulsora de mi corazón y apoyo en todo momento.

A quien por toda mi vida ha sido mi todo, la persona que me ha brindado amor, ternura, alegrías, consejos y sobre todo libertad... libertad de crecer y aprender, a ti mi hermosa madre.

A Víctor, por todo el amor que día a día me das, por tu pasión a esta relación y por ser la paz en mi corazón.

A las dos personas que de niña me cuidaron y que siempre han tenido una oración para mi, gracias abuelitos por su experiencia y cariño, gracias Lenis y Memin.

A quienes me han visto como una hermana, a mis tíos: papá Saúl, papi Juan, Guillermo y Orlando. A las mejores tías: Gis, Carío y Quina. Con mucho amor.

A mis primos adorados Rolo, Sandy, Aline y Cesar sin olvidarme de los grandes: hermano Héctor, Cinthy, Israel, Sergio y Toño.

A mis simpáticos sobrinos Moshe, Aranza, Miguel, Saulito, Meli y el pequeño David.

A la persona que no está más con nosotros pero sabes que todo lo que hago, lo hago pensando en ti... con amor a Roberto Carlos Murguía Roldán (1983- 2007)

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo económico con el cual pude realizar mi Maestría.

A la Dra. Libia I. Trejo Téllez, por todas las observaciones realizadas para bien de mi preparación, por los consejos personales y las alegrías dentro de esta Institución.

Al Dr. Fernando C. Gómez Merino, por sus siempre acertadas observaciones.

A la Dra. Alejandrina Robledo Paz, por sus valiosas aportaciones en la realización de esta investigación.

A los Doctores que fueron mis profesores a lo largo de mi formación como Maestra en Ciencias: Dra. Trejo Téllez, Dr. Gómez Merino, Dr. Kohashi, Dr. Etchevers, Dr. Prometeo, Dr. Gavi, Dra. Nieves, Dr. Tirado.

Al personal de Edafología, a Laurita por siempre llenar mis formatos y a Lupita por su apoyo dentro del laboratorio de Nutrición Vegetal.

Al personal de edificio central a Susy por su tiempo y a Nathy por todas las asesorías.

Al personal de la biblioteca, gracias Don Ray por su ayuda en mis horas de documentación.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE GENERAL	v
INDICE DE CUADROS	vii
INDICE DE FIGURAS	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1. GENERALIDADES DE <i>Laelia anceps</i>	2
2.1.1. Hábitat de desarrollo y tipo de crecimiento	3
2.1.2. Descripción morfológica de las orquídeas	3
2.1.3. Descripción morfológica de <i>Laelia anceps</i>	6
2.1.4. Clasificación científica de <i>Laelia anceps</i>	7
2.1.5. Distribución geográfica natural y ecológica de <i>Laelia anceps</i>	8
2.1.6. Requerimientos climáticos y de fertilización	9
2.2. REPRODUCCIÓN <i>in vitro</i>	15
2.2.1. Antecedentes de la reproducción <i>in vitro</i> de orquídeas	15
2.2.2. Reproducción <i>in vitro</i>	16
2.2.3. Reproducción a partir de semillas	18
2.2.4. Reproducción asexual	19
2.2.5. Medios de cultivo	21
2.2.6. Medios de cultivo alternativos en la propagación de <i>Laelia</i> <i>anceps</i>	24
2.2.6.1. Bonote de coco	24
2.2.6.2. Promix	27
2.2.6.3. Solución nutritiva de Steiner	29
2.3. CONCLUSIONES DE LA REVISIÓN DE LITERATURA	30
III. JUSTIFICACIÓN	31
IV. OBJETIVOS	32
4.1. OBJETIVO GENERAL	32
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES	32
V. HIPÓTESIS GENERAL	33
5.1. HIPÓTESIS PARTICULARES	33
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	34
6.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO	34
6.2. MATERIAL VEGETAL	34

6.3. ANÁLISIS QUÍMICO DE MEDIOS DE CULTIVO	34
6.4. ANÁLISIS QUÍMICO DE PLÁNTULAS DE <i>Laelia anceps</i>	35
6.5. DISEÑO EXPERIMENTAL Y DE TRATAMIENTOS	35
6.6. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO	36
6.7. CONDICIONES DE INCUBACIÓN	36
6.8. VARIABLES EVALUADAS	36
6.8.1. Análisis químico de medios de cultivo	36
6.8.2. Contaminación del cultivo	37
6.8.3. Variables de crecimiento	37
6.8.4. Variables de calidad	37
6.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
7.1. Concentraciones nutrimentales en los medios de crecimiento	39
7.2. Contaminación del cultivo	47
7.3. Variables de crecimiento	52
7.3.1. Altura de explante	52
7.3.2. Longitud de raíces	57
7.3.3. Biomasa seca de la parte aérea	62
7.3.4. Biomasa seca de raíces	65
7.4. Variables de calidad	68
7.4.1. Concentración nutrimental en parte aérea	68
7.4.2. Concentración nutrimental en raíces	76
7.4.3. Acumulación nutrimental	81
7.4.3.1. Acumulación nutrimental en parte aérea	81
7.4.3.2. Acumulación nutrimental en raíces	86
VIII. RECOMENDACIONES	90
IX. CONCLUSIONES	91
X. LITERATURA	93

## INDICE DE CUADROS

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b>	Clasificación científica de <i>Laelia anceps</i> 8
<b>Cuadro 2.</b>	Temperaturas óptimas para algunas orquídeas 10
<b>Cuadro 3.</b>	Intervalos ideales de intensidad luminosa para algunas orquídeas 11
<b>Cuadro 4.</b>	Fertilización de propósito múltiple 12
<b>Cuadro 5.</b>	Función de dosis de fertilización 13
<b>Cuadro 6.</b>	Tipo de sustrato de acuerdo al grosor de la raíz 14
<b>Cuadro 7.</b>	Tipos de sustratos usados en orquídeas 14
<b>Cuadro 8.</b>	Principales características químicas de fibra de coco 26
<b>Cuadro 9.</b>	Contenidos de nutrimentos en Promix 28
<b>Cuadro 10.</b>	Concentración de nutrimentos en los medios de cultivo Murashige y Skook y solución de Steiner a los 0 y 20 ddt. 42
<b>Cuadro 11.</b>	Concentración de nutrimentos en los medios de cultivo fibra de coco y Promix a los 40 y 60 ddt. 43
<b>Cuadro 12.</b>	Comparación de valores de porcentaje acumulado de contaminación entre tratamientos, a los días 20, 40 y 60 de cultivo 49
<b>Cuadro 13.</b>	Concentración nutrimental en plántulas de <i>L. anceps</i> a 20 ddt 70
<b>Cuadro 14.</b>	Concentración nutrimental en parte aérea de plántulas de <i>L. anceps</i> a 40 ddt 71
<b>Cuadro 15.</b>	Concentración nutrimental en parte aérea en <i>L. anceps</i> a 60 ddt 73
<b>Cuadro 16.</b>	Concentración nutrimental en raíces de <i>L. anceps</i> a 40 ddt 78
<b>Cuadro 17.</b>	Concentración nutrimental en raíces de <i>L. anceps</i> a 60 ddt 79
<b>Cuadro 18.</b>	Acumulación de nutrimentos en <i>L. anceps</i> a 20 ddt 81
<b>Cuadro 19.</b>	Acumulación de nutrimentos en parte aérea en <i>L. anceps</i> a 40 ddt 83
<b>Cuadro 20.</b>	Acumulación de nutrimentos en parte aérea en <i>L. anceps</i> a 60 ddt 85

<b>Cuadro 21.</b>	Acumulación nutrimental en raíces de <i>L. aniceps</i> a 40 ddt	86
<b>Cuadro 22.</b>	Acumulación nutrimental en raíces de <i>L. aniceps</i> a 60 ddt	88

## INDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Concentración de macronutrientes en los medios de cultivo empleados para la propagación <i>in vitro</i> de <i>L. anceps</i>	40
<b>Figura 2.</b> Concentración de micronutrientes en los medios de cultivo empleados para la propagación <i>in vitro</i> de <i>L. anceps</i>	41
<b>Figura 3.</b> Concentración de sodio inicial en los medios de de cultivo empleados para la propagación <i>in vitro</i> de <i>L. anceps</i>	42
<b>Figura 4.</b> Altura de explantes de <i>L. anceps</i> establecidas en medios de cultivo, medio MS (T1) y Solución de Steiner (T2) a 20 días de tratamiento. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$ ).	52
<b>Figura 5.</b> Altura de explantes de <i>L. anceps</i> establecidas en medios de cultivo: fibra de coco (T3) y Promix (T4) a 40 días de tratamiento. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$ ).	53
<b>Figura 6.</b> Altura de explantes de <i>L. anceps</i> establecidas en medios de cultivo: fibra de coco (T3) y Promix (T4) a 60 días de tratamiento. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$ ).	54
<b>Figura 7.</b> Crecimiento de explantes de <i>L. anceps</i> en tratamientos de fibra de coco (T3) y Promix (T4) durante 60 ddt.	54

<b>Figura 8.</b>	Longitud de raíz de plántulas de <i>L. anceps</i> en medios MS y Solución de Steiner a 20 ddt. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$ ).	57
<b>Figura 9.</b>	Longitud de raíz de plántulas de <i>L. anceps</i> en medios conteniendo fibra de coco y Promix a 40 ddt. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$ ).	58
<b>Figura 10.</b>	Longitud de raíz de plántulas de <i>L. anceps</i> en medios conteniendo fibra de coco y Promix a 60 ddt. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$ ).	58
<b>Figura 11.</b>	Crecimiento de raíz de <i>L. anceps</i> en medios de crecimiento con fibra de coco (T3) y Promix (T4) durante 60 ddt.	59
<b>Figura 12.</b>	Biomasa peso seco total de plántulas de <i>L. anceps</i> a 20 ddt. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$ ).	62
<b>Figura 13.</b>	Biomasa seca de parte aérea de plántulas de <i>L. anceps</i> a 40 ddt. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$ ).	63
<b>Figura 14.</b>	Biomasa seca de parte aérea de plántulas de <i>L. anceps</i> a 60 ddt. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$ ).	63
<b>Figura 15.</b>	Biomasa seca de parte aérea en <i>L. anceps</i> en los periodos 40 y 60 ddt.	64

- Figura 16.** Biomasa seca de raíces de *L. anceps* en tratamientos T3 y T4 a 40 ddt. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). 66
- Figura 17.** Biomasa seca de raíces de *L. anceps* en tratamientos T3 y T4 a 60 ddt. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). 66
- Figura 18.** Biomasa seca de raíces en plántulas de *L. anceps* a los 40 y 60 ddt. 67
- Figura 19.** Concentración de los macronutrientes: (a) fósforo, (b) potasio, (c) calcio y (d) magnesio en explantes de *L. anceps* después de 20 ddt con los medios de cultivos MS y solución de Steiner. Letras distintas sobre las barras en cada subfigura indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). 69
- Figura 20.** Concentración de los micronutrientes: (a) hierro, (b) zinc, (c) manganeso, (d) boro y (e) sodio en explantes de *L. anceps* después de 20 ddt con los medios de cultivos MS y solución de Steiner. Letras distintas sobre las barras en cada subfigura indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). 70
- Figura 21.** Concentración de (a) fósforo y (b) cobre en parte aérea de plántulas de *L. anceps* después de 40 ddt con los medios de cultivos MS y solución de Steiner. Letras distintas sobre las barras en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). 72

- Figura 22.** Concentración de (a) calcio y (b) zinc en parte aérea de explantes de *L. anceps* después de 60 ddt con los medios de cultivos MS y solución de Steiner. Letras distintas sobre las barras en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).
- 74
- Figura 23.** Concentración de macronutrientes: (a) fósforo, (b) potasio, (c) calcio y (d) magnesio en raíces de explantes de *L. anceps* después de 40 ddt con los medios de cultivos conteniendo fibra de coco y promix. Letras distintas sobre las barras en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).
- 77
- Figura 24.** Concentración de micronutrientes: (a) hierro, (b) zinc, (c) manganeso, (d) boro y (f) sodio en raíces de explantes de *L. anceps* después de 40 ddt con los medios de cultivo conteniendo fibra de coco y promix. Letras distintas sobre las barras en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).
- 78
- Figura 25.** Concentración de (a) potasio, (b) calcio y (c) magnesio en raíces de explantes de *L. anceps* después de 60 ddt con los medios de cultivos conteniendo fibra de coco y promix. Letras distintas sobre las barras en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).
- 80
- Figura 26.** Acumulación de (a) fósforo, (b) potasio, (c) calcio, (d) magnesio, (e) hierro, (f) zinc, (g) boro y (h) sodio en explantes de *L. anceps* después de 20 ddt con los medios de cultivos MS y solución de Steiner. Letras distintas sobre las barras en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).
- 82

**Figura 27.** Acumulación de (a) calcio, (b) magnesio y (c) sodio en explantes de *L. anceps* después de 40 ddt con los medios de cultivo conteniendo fibra de coco y promix. Letras distintas sobre las barras en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

84

**Figura 28.** Acumulación de (a) calcio y (b) zinc en la parte aérea de explantes de *L. anceps* después de 60 ddt con los medios de cultivo conteniendo fibra de coco y promix. Letras distintas sobre las barras en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

85

**Figura 29.** Acumulación de (a) fósforo, (b) potasio, (c) calcio, (d) magnesio, (e) cobre, (f) zinc, (g) manganeso, (h) boro y (i) sodio en raíces de *L. anceps* después de 40 ddt con los medios de cultivo conteniendo fibra de coco y promix. Letras distintas sobre las barras en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

87

**Figura 30.** Acumulación de (a) potasio, (b) calcio y (c) sodio, en las raíces de explantes de *L. anceps* después de 60 ddt con los medios de cultivo conteniendo fibra de coco y promix. Letras distintas sobre las barras en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

89

## I. INTRODUCCIÓN

El uso de la técnica de propagación *in vitro* permite la obtención de mayor cantidad de germoplasma, sin que ello implique un riesgo para la especie en cuestión.

En México existen pocas investigaciones sobre reproducción *in vitro* de especies endémicas como lo son las orquídeas. Este tipo de herramienta es importante para la conservación de especies. Diversos son los factores que intervienen en el éxito de la reproducción *in vitro*, tales como, el fotoperiodo, intensidad de luz, humedad y la selección de un medio nutritivo específico para cada etapa de desarrollo del material vegetal. Si bien es cierto cada factor merece ser analizado, el tema de la presente investigación se enfoca en los medios de cultivo.

Los medios nutritivos empleados en la reproducción *in vitro* han sido tema de artículos desde inicios del siglo pasado. Las respuestas obtenidas dependerán en mucho del material vegetal con que se trabaje. En la actualidad existe un amplio catálogo de medios que fomentan la propagación *in vitro* y a pesar de ello, los costos de producción resultan ser elevados, probablemente porque, el factor económico no ha resultado ser tema de discusión. El uso de medios líquidos en la propagación *in vitro* de *Laelia anceps* representa una opción, ya que representa una forma práctica de propagar que reduciría de manera importante el costo de producción sin mermar la calidad del material vegetal.

Es por eso que la presente investigación plantea la posibilidad de propagar brotes vegetativos de la especie *Laelia anceps* en sustratos líquidos, alternativos al medio usual gelificado, con el objetivo de obtener plántulas de calidad, a un menor costo de producción

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. GENERALIDADES DE *Laelia anceps*

México cuenta con una gran variedad de orquídeas. Las especies de esta familia, en extremo hermosas, extrañas y frágiles, se caracterizan por una difícil domesticación, resultado del fuerte arraigo hacia sus entornos. Las Orquidáceas son indicadoras del equilibrio entre el desarrollo de la civilización y el respeto a la naturaleza, pues la alteración de un nicho ecológico suele significar, desde la pérdida de una gran cantidad de estas plantas, hasta la desaparición de especies endémicas (Sarmiento, 2000).

Las orquídeas constituyen un punto importante dentro de la realeza en el mundo de las plantas ornamentales. Se trata de una de las especies más mimadas y ocupan las primeras posiciones entre todas las plantas con flores por su valor en la producción de flor de corte, alcanzando un precio muy alto en el mercado internacional (Winkelmann *et al.*, 2006).

Cuando la utilidad de un recurso biótico es regida por sus características biológicas y por el entorno cultural, es importante emprender estrategias para su conservación; en particular, si son endémicos de nuestro país, ello requiere cuidado especial al ser estos organismos sometidos a colectas intensivas de individuos silvestres y a la perturbación del hábitat (Santos *et al.*, 2006).

*Laelia anceps* es una orquídea silvestre, epífita, que actualmente se encuentra en grave peligro de extinción, debido principalmente al fuerte saqueo al que ha sido expuesta desde hace muchos años. El género *Laelia* está compuesto por 11 especies epífitas, todas ellas sobresalientes por su gran atractivo (Lee *et al.*, 2007).

### **2.1.1. Hábitat de desarrollo y tipo de crecimiento**

De acuerdo al lugar de desarrollo de una orquídea se determina su hábitat. Por tanto, aquellas orquídeas que se desarrollan únicamente sobre ramas y troncos de los árboles sin penetrarlos (sólo cumpliendo la función de soporte) y cuyo alimento lo obtienen del aire, agua de lluvia y desechos de la corteza del árbol, se llaman epífitas (SCO, 1965).

Por otro lado, aquellas orquídeas que se desarrollan a nivel de suelo, en este caso el pseudobulbo se ha modificado y las raíces cumplen la función de almacenamiento, estas orquídeas se llaman terrestres. Existen otras que se llaman litófitas las cuales crecen sobre rocas (SCO, 1965).

A partir del tipo de crecimiento que presente una orquídea se clasifican en monopodial y simpodial; las primeras crecen de manera erguida cuyo tallo no se ramifica, al cual se insertan las hojas y no presentan pseudobulbos; las segundas presentan un rizoma que crece de forma horizontal, del cual surgen pseudobulbos con crecimiento vertical y a medida que crece el rizoma surgen nuevos pseudobulbos que dan origen a otra planta y por último, las orquídeas que crecen a lo largo y hacia arriba sosteniéndose de un tutor, tal crecimiento es trepador, probablemente se puede considerar un cuarto caso y es el rastrero tal crecimiento se da a nivel del suelo (SCO, 1965).

### **2.1.2. Descripción morfológica de las orquídeas**

Las orquídeas se consideran como la familia más evolucionada dentro del reino vegetal, ya que presentan una gran complejidad y especialización en su morfología floral y en sus tipos de polinización. Asimismo existen dentro de la familia muy diversas formas de vida y desde el punto de vista ecológico muchos de sus integrantes son componentes importantes en diversos tipos de vegetación (Espejo, 2002).

La característica principal de las raíces de orquídeas es que presentan alrededor de la raíz auténtica una capa de tejido esponjoso llamado velamen, que se desarrolla en las especies terrestres, epífitas o litófilas (Gil, 2007).

Las raíces son de color gris a blanco, presentando un ápice meristemático que absorbe la humedad y las pequeñas cantidades de nutrimentos que la planta necesita. Este ápice tiene una coloración verde, lo cual cumple con la función de realizar parte de la fotosíntesis de la planta. Las modificaciones y tipos de raíces que pueden presentarse en las orquídeas son: fibrosas, tuberosas, tipo bulbo, carnosas sin rizoma, carnosas con rizoma, raíces aéreas (Gil, 2007).

La orquídea tiene como regla general un aspecto herbáceo, aunque las hay en una variadísima gama de formas; ello se debe principalmente a su clima y hábitos característicos en su medio natural (SCO, 1965).

Las hojas de las orquídeas son las que más carácter herbáceo presenta de todas las plantas. Como todas las monocotiledóneas las nervaduras en la hoja se distribuyen paralelas entre sí a lo largo de ella (SCO, 1965).

Varían mucho en tamaño y consistencia, pudiendo ser simples, paralelinerves, sésiles o pediceladas, alargadas y generalmente persistentes. Por su colocación pueden ser alterna helicoidal, opuestas y en algunos casos sólo presentan una hoja verdadera. Las hojas pueden ser terminales, insertadas a lo largo del pseudobulbo, en forma de roseta y solitarias variando en número (Gil, 2007).

Las orquídeas presentan dos tipos de tallo: monopodial y simpodial. Las orquídeas monopodiales poseen un tallo con un eje que continua ininterrumpidamente su crecimiento terminal y produce hojas a medida que crece; en las axilas de las hojas, se desarrollan en forma periódica las flores (Soto, 1993).

En las orquídeas simpodiales, se distinguen dos tipos de ejes: un rizoma rastrero u horizontal que a intervalos tiene callos carnosos, verticales o pseudobulbos, con hojas y flores terminales. Los tallos verticales de las orquídeas simpodiales tienen crecimiento determinado; es decir, después de la producción de cierto número de

hojas, se detiene abruptamente el crecimiento, o termina con la producción de inflorescencias. Después de la floración, una yema vegetativa comienza a crecer en la base del pseudobulbo formando nuevamente un rizoma postrado, con pseudobulbo, hojas y flores (Soto, 1993).

Los pseudobulbos pueden tener formas muy variables de acuerdo a su género y/o especie siendo las más comunes: globoso, ovoide, oblongo, cilíndrico y segmentado, claviforme y fusiforme (Gil, 2007).

Las flores de las orquídeas tienen una alta variabilidad puesto que han evolucionado en función de facilitar la fecundación. Pese a la gran variedad de flores en la familia, todas tienen su diagrama floral idéntico consistente en: un labelo, esto es tres pétalos y dos pétalos laterales, tres sépalos, órganos sexuales fusionados formando una “columna” y ovario ínfero (SCO, 1965).

El labelo, éste es un pétalo modificado, el cual presenta modificaciones en color y forma, de mayor tamaño y vistosidad, ya que es el encargado de atraer a los agentes polinizadores (Gil, 2007).

La flor de orquídea es un tipo especial de flor irregular que tiene simetría bilateral (zigomorfa). Se puede cortar solamente en un plano y se dividirá en dos mitades iguales. Cortando la flor en cualquier otro plano resultaría en dos trozos irregulares (Larson, 2004).

Éstas son hermafroditas, en el interior se encuentran las estructuras reproductivas de la orquídea (antera y pistilo) que se han unido en una estructura cerosa llamada columna o ginandrio (Gil, 2007).

Dentro de la flor los granos de polen se aglutinan en pequeños paquetes llamados polinias, el número de polinias depende de la especie, por tanto el número de éstos y su disposición dentro de la flor pueden ser utilizados para la identificación de la misma, por ejemplo, *Cattleya* tiene cuatro, mientras que *Laelia* tiene ocho (Larson, 2004).

Las flores de orquídea producen copiosas cantidades de semillas. Una sola vaina puede contener entre 500 000 y un millón de semillas diminutas, dichas semillas carecen de endospermo y con frecuencia se les llama “semillas desnudas”. Como no contienen endospermo, no pueden germinar en estado silvestre sin ayuda de algún hongo, mientras que en condiciones de laboratorio tienen que ser germinadas asépticamente con abastecimiento de todas las sustancias químicas para su nutrición contenidas en un medio de germinación (Larson, 2004).

El fruto de las orquídeas es una cápsula dehiscente aunque en algunos casos puede ser una vaina, del mismo tipo de la vainilla (*Vanilla* spp.). Comúnmente las cápsulas son de formas ovoides, elípticas, cilíndricas o piriformes, pueden medir de 0.5 a 5 cm de diámetro y de 0.5 hasta casi 15 cm de largo dependiendo del género y la especie (Sheehan, 1994).

### **2.1.3. Descripción morfológica de *Laelia anceps***

La especie *Laelia anceps* fue descrita por John Lindley en 1835, con base en ejemplares importados por la firma Loddiges y Sons, y que florecieron en diciembre de 1834, en Hackney, Inglaterra. Las plantas originales eran la forma más común con sépalos y pétalos rosados y el lóbulo medio del labelo oscuro. Muy pronto aparecieron otras flores con características distintas, que fueron descritas como variedades; la primera de ellas fue la variedad *Barkeriana*, de segmentos angostos y labelo más oscuro. Posteriormente, numerosas variedades fueron descritas, especialmente al final del siglo XIX (Soto, 1993).

Se han reconocido tres grupos de variación morfológica en las poblaciones del complejo *Laelia anceps*. Las diferencias en color entre los tres grupos es la característica más notable; por lo que, se ha preferido incluir a todo el complejo dentro de una sola especie variable, con dos subespecies geográficamente definidas una, la subespecie típica, en la vertiente atlántica de México, Guatemala y Honduras; y otra subespecie en la vertiente pacífica de la Sierra Madre del Sur. Las diferencias de color tan notables entre las plantas de la Sierra Madre del Sur

justifican el establecimiento de formas, que además han sido reconocidas informalmente en horticultura (Soto, 1993).

*Laelia anceps* posee pétalos angostamente elípticos a elípticos, callo poco alzado, con 3 lamelas terminales, lóbulo medio del labelo oblongo, poblaciones de flores rosa y púrpura, se localizan en el este y sureste de México, Guatemala y Honduras.

#### **2.1.4. Clasificación científica de *Laelia anceps***

La familia de las orquídeas es enorme, el más grande en el reino vegetal con alrededor de 800 géneros, 17 ,500 especies, distribuidas en todo el mundo (Dole, 2004).

Desde el punto de vista taxonómico, las orquídeas son un grupo único de plantas. Son bastante diferentes vegetativamente, pero todas las especies pueden ser agrupadas por sus características florales como miembros de esta inmensa familia (Larson, 2004).

La clasificación de la familia es bastante técnica y esencialmente basada en los caracteres de la columna y en niveles superiores en la naturaleza de la polinia. Para su clasificación no se utilizan las formas de vida, distribución o el espectro ecológico de las especies. Sin embargo parece estar bastante correlacionada con los desarrollos evolutivos del grupo más aceptado por la mayoría de los autores (Gil, 2007).

*Laelia* es un género que hasta hace poco tenía unas 60 especies de orquídeas epífitas de la subtribu Laeliinae de la familia Orchidaceae, ahora se han quedado en sólo 11 especies. (White, 1996). En el Cuadro 1, se muestra la clasificación científica de *Laelia anceps*.

**Cuadro 1.** Clasificación científica de *Laelia anceps* (White, 1996).

---

<b>Reino :</b>	Plantae
<b>División :</b>	Magnoliophyta
<b>Clase :</b>	Liliopsida
<b>Orden :</b>	Aparagales
<b>Familia :</b>	Orchidaceae
<b>Subfamilia :</b>	Epidendroideae
<b>Tribu :</b>	Epidendreae
<b>Subtribu :</b>	Laeliinae
<b>Alianza :</b>	Catleya
<b>Género :</b>	<i>Laelia</i> (Lindl.1831)

---

#### **2.1.5. Distribución geográfica natural y ecología de *Laelia anceps***

Las orquídeas son plantas que están distribuidas en casi todo el mundo, salvo en las regiones polares y en los grandes desiertos.

El 85% de las especies están presentes en las zonas tropicales o subtropicales, donde las plantas epífitas superan a las que crecen en el suelo, ya que por falta de frío invernal pueden exponer sus raíces al aire. El 15% restante se encuentra en las regiones templadas (Medina, 1985).

Las orquídeas tropicales, están repartidas en tres continentes:

- a. África tropical e islas del este.
- b. Asia tropical y sus islas.
- c. América tropical que comprende México, América Central y Sudamérica.

Los primeros cultivares conocidos de *L. anceps* son probablemente originarios del centro de Veracruz y es a partir de 1985 que empezaron a importarlas a Europa, y el primero de estos especímenes fue el cv. Dawsonii que fue colectado en el mismo año, en los alrededores de Juquila, Oaxaca (Soto, 1993).

Esta especie se encuentra localizada principalmente en las vertientes del Golfo y Pacífico mexicanos (Halbinger, 1993).

En Chiapas y en el norte de Oaxaca, *Laelia anceps* crece en bosques secos, bajo de pinos y encinos, aproximadamente a 1 500 m de altitud, su presencia se restringe a las laderas de sotavento o a los cañones donde la sombra orográfica es marcada, ya que la sierra de estos estados tienen precipitación copiosa (Soto, 1993).

Siguiendo hacia el norte, *L. anceps* llega a ser abundante en el centro de Veracruz, desde la región de Zongolica hasta la de Naolinco. El hábitat donde es más abundante es el bosque cálido de encinos que se establece de manera intermedia entre el bosque de neblina y el bosque tropical deciduo entre 700 y 1200 m de altitud; sin embargo, puede aparecer en muchos otros ambientes (Soto, 1993).

En la Sierra Madre Oriental, se encuentran poblaciones relativamente pequeñas de *L. anceps* desde Puebla hasta la región de Gómez Farías, Tamaulipas y hay reportes de su existencia en las montañas cercanas a Monterrey, Nuevo León; el hábitat de *L. anceps* en la Sierra Madre Oriental es seco durante la primavera; en Hidalgo, incluso es semiárido; en San Luis Potosí y Tamaulipas se encuentra en bosques relativamente más húmedos. Cerca de Gómez Farías, crece a tan sólo 550 m de altitud, en la transición entre la selva subdecidua y el bosque de neblina.

#### **2.1.6. Requerimientos climáticos y de fertilización**

El cultivo de las orquídeas se desarrolla en gran variedad de climas y condiciones ambientales. Las diferentes especies de orquídeas tienen requerimientos climáticos distintos y lo mejor para lograr éxito en su cultivo es el estudio perseverante de las necesidades en particular (FUNPROVER, 2004).

El cultivo de las orquídeas en invernadero, se debe regular adecuadamente humedad, luminosidad y temperatura.

La humedad relativa debe ser de 70%; cuando ésta sube demasiado, se favorece el desarrollo de enfermedades fungosas en las flores, por lo que es muy importante el constante movimiento del aire dentro del invernadero, que se logra mediante ventiladores

Por regla general, la humedad ambiental para el cultivo de orquídeas debe aumentarse en la estación estival y disminuirse en la invernal, ya que estas variaciones se presentan en la naturaleza (Gil, 2007).

Cuando la transpiración es intensa, como consecuencia de la falta de humedad en el ambiente o por las altas temperaturas, puede ocurrir mayor concentración de sales en las partes donde se realiza la fotosíntesis y quedar disminuida esta función (Salisbury y Ross, 1994).

Las orquídeas requieren temperaturas diurnas de 13 a 32 °C y temperaturas nocturnas de 10 a 21 °C, dependiendo, como antes se dijo, de necesidades particulares de cultivo. Las orquídeas, en términos generales, se pueden dividir en tres categorías: de clima frío, intermedio y cálido, según donde crecen en su estado natural (Murguía, 2004). En el **Cuadro 2** se presentan las temperaturas óptimas para algunos tipos de orquídeas.

**Cuadro 2.** Temperaturas óptimas para algunas orquídeas (Gil, 2007).

<b>Clima</b>	<b>Orquídea</b>	<b>Temperatura diurna aproximada</b>	<b>Temperatura nocturna aproximada</b>
Frío	<i>Cymbidium, Odontoglossum</i>	>10 °C	10 °C
Intermedio	<i>Cattleya, algunas Oncidium</i>	18 a 24 °C	13 a 16 °C
Cálido	<i>Vanda y Phalaenopsis</i>	21 a 30 °C	18 a 21 °C

Una orquídea requiere la máxima cantidad de luz, sin lesionar la planta, la cual es necesaria para que ésta crezca y se desarrolle bien. La cantidad de luz que los diferentes géneros de orquídeas pueden tolerar, sin lesionarse, varía

grandemente, siendo importante considerar la etapa de crecimiento de la planta (Murguía, 2004).

De acuerdo con los conocedores, una manera de saber cuánta luz darle a nuestras plantas, es observando sus características, si tiene hojas duras y carnosas necesita más luz y si sus hojas son blandas, anchas y finas necesita más sombra. Demasiada luz decolora el verde de las hojas tornándolas amarillentas y dificultando su crecimiento, por lo contrario la poca luz da a las hojas un tono verde oscuro, impidiendo el desarrollo y anulando la floración. En ambos casos se retrasa el crecimiento y se reduce o evita la floración. La cantidad correcta de luz produce una coloración “verde lechuga” generando una superficie brillante, en los brotes nuevos y la planta florece regularmente (Gil, 2007). En el **Cuadro 3** se dan algunos ejemplos por géneros de intervalos de intensidad luminosa.

**Cuadro 3.** Intervalos ideales de intensidad luminosa para algunas orquídeas (Neville, 2001).

<b>Género</b>	<i>Brassalova</i>	<i>Brasia</i>	<i>Catleya</i>	<i>Cymbidium</i>	<i>Dendrobium</i>	<i>Epidendrum</i>	<i>Laelia</i>	<i>Oncidium</i>
<b>Intensidad luminosa, Lux</b>								
<b>10764</b>								
<b>16146</b>					X	X		
<b>21528</b>	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>26910</b>	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>32292</b>	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>37674</b>	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>43057</b>	X			X	X	X	X	X

Intervalos: Bajo (10764-16146 Lux); Medio (21528 a 32292); Alto (32292 a 43057).

Diversos son los factores a considerar en la conservación de las orquídeas y sin duda la determinación de parámetros de intensidad luminosa es un elemento a considerar dependiendo el género.

Las orquídeas son de lento crecimiento y con periodos largos de descanso, además las orquídeas tienen la dificultad para captar agua y nutrientes, sobre todo aquellas que viven sobre los árboles, por ello, estas plantas tienen bajos requerimientos nutrimentales y su fertilización es relativamente sencilla (Gil, 2007).

Un programa de fertilización debe considerar factores como la especie, etapa de crecimiento de la planta, el método de cultivo, el sustrato, las condiciones de luz, temperatura y humedad para tener un adecuado desarrollo de las plantas (Kuan y González, 1993).

El proceso de fertilización está constituido por tres apartados con fines específicos para el desarrollo del cultivo.

#### a) Fertilización de propósito múltiple

El objeto de realizar una fertilización de este tipo consiste en promover la formación de brotes, hojas, flores y frutos.

Tomando en cuenta que *Laelia anceps* es una orquídea epífita, su fertilización no debe ser excesiva ya que en condiciones naturales están habituadas a una escasez de nutrimentos. La propuesta de diferentes niveles de fertilización con la especificación de la dosis y días entre fertilización queda expuesto en el **Cuadro 4**.

**Cuadro 4.** Fertilización de propósito múltiple (Gil, 2007).

Fertilizante	Dosis (g L <sup>-1</sup> )	Días entre cada fertilización
Triple 15-15-15	1-2	8
Triple 17-17-17	1-2	8
Triple 18-18-18	1-2	8
Triple 20-20-20	1-2	8

## b) Fertilización para enraizamiento

La removilización o translocación de los nutrimentos desde tejidos de acumulación hacia órganos demanda es una estrategia clave de los vegetales para compensar los desequilibrios oferta-demanda estacionales, ya que les permite, parcial y provisionalmente, ser independientes de la disponibilidad externa (Oliet *et al.*, 2008).

La frecuencia de fertilización es regularmente cada 8 días; la solución nutritiva se aplica en forma de aspersión con una bomba de mochila mojando perfectamente las hojas, pseudobulbos y raíces. Si se maneja solución hidropónica, la aplicación se realiza mediante riego por goteo (Gil, 2007). De acuerdo a Oliet *et al.* (2008), el proceso de fertilización en el árbol encina aumentó significativamente el potencial de enraizamiento y se encontró una correlación significativa y positiva entre el potencial de enraizamiento y la concentración de P en raíz.

## c) Fertilización para diferentes etapas de desarrollo

Productos que contienen macro y micronutrimentos repercuten en un mejor desarrollo para las plantas. La diversidad de fertilizantes que se pueden emplear en las diferentes etapas de desarrollo de las orquídeas se observan en el **Cuadro 5**.

**Cuadro 5.** Función de dosis de fertilización (Gil, 2007).

Fertilizante	Función	Dosis (g L <sup>-1</sup> )
22-10-25 + micronutrimentos	Floración y desarrollo de cápsulas	1
13-36-13 + MgO + micronutrimentos	Floración y enraizamiento	1
15-30-15 + micronutrimentos	Floración y enraizamiento	1
18-18-18 + micronutrimentos	Multipropósito	1
19-19-19 + micronutrimentos	Multipropósito	1
26-12-12 + 2 MgO + micronutrimentos	Para desarrollo vegetativo (hojas y tallos)	1

Antes de decidir sobre qué sustrato colocar las orquídeas, se deberá tener presente lo siguiente: exigencias de la planta, si es epífita o terrestre, si se trata de un híbrido, la procedencia de sus progenitores, la humedad relativa, la luz, cantidad de agua y el tipo de recipiente (FUNPROVER, 2004). Siendo el indicador por excelencia en la selección del sustrato el grosor de la raíz (**Cuadro 6**).

**Cuadro 6.** Tipo de sustrato de acuerdo al grosor de la raíz (Gil, 2007).

<b>Grosor de la raíz</b>	<b>Tamaño de partícula del sustrato</b>
Gruesa	Grande
Delgada	¼ '' (grado de plántula o grado fino)
Mediano	½ '' (grado medio)
Grande	¾ '' (grado grueso o grande)

En cuanto a la procedencia del material, éste se clasifica en orgánico e inorgánico y son diversos los materiales que se han utilizado para el establecimiento de las orquídeas (**Cuadro 7**).

**Cuadro 7.** Tipos de sustratos usados en orquídeas (Gil, 2007).

<b>Sustrato orgánico</b>	<b>Sustrato inorgánico</b>
Corteza de árbol	Oasis
Raíz de helecho	Piedra volcánica negra o roja (tezontle)
Musgo	Lana mineral
Fibra de coco	Vermiculita
Corcho	Perlita
Caña de azúcar	Trozos de ladrillo
Carbón	
Musgo blanco	

## **2.2. REPRODUCCIÓN *in vitro***

### **2.2.1. Antecedentes de la reproducción *in vitro* de orquídeas**

La micropropagación de orquídeas, de forma moderna comienza en 1949, con un nuevo (cultivo de tejidos o *in vitro*) simple y práctico método de propagación vegetativa (clonal) de *Phalaenopsis* (orquídea) que fue desarrollado en la Universidad de Cornell, cinco años antes el primer reporte publicado a partir de tallo de orquídeas (Arditti, 1996).

El medio nutritivo utilizado para este cultivo fue el Knudson C (KC), formulado para la germinación asimbiótica de semillas de orquídeas por Lewis Knudson, Profesor de Fisiología de Plantas de la Universidad de Cornell (Arditti, 1996).

Desde que Knudson desarrolló un método de cultivo *in vitro* asimbiótico para la germinación de semillas de orquídeas, el cultivo de tejido (*in vitro*) tuvo un papel importante y significativo en el cultivo, propagación, crecimiento y conservación de especies de orquídeas y de híbridos (Yoneo, 1991).

La solución Knudson C todavía se utiliza para la germinación de semillas de orquídeas y en la micropropagación de algunas orquídeas.

Gavino Rotor Jr.(1949), concibió la idea de propagación de orquídeas, atendiendo la función del azúcar en el desarrollo de las plantas. El cultivo con cortes de inflorescencias de *Phalaenopsis* y secciones nodales, cada uno con un brote en medio KC, con la idea de que se produjeran plantas. Los brotes mostraron hojas después de 14 a 60 días, la producción de raíces se dio después del desarrollo de 2 a 3 hojas, sólo 7 de 65 brotes fallaron en el proceso de desarrollo (Arditti, 1996).

Rotor Jr. inventó la micropropagación de orquídeas y fue el primero en publicar un reporte científico en multiplicación clonal de una planta superior *in vitro*; sentando las bases del uso de un medio de cultivo nutritivo, técnicas asépticas y el uso de explantes en orquídeas (Arditti, 1996).

Desde que Morel y Wimber demostraron la aplicabilidad del cultivo de tejidos como una propagación clonal rápida de orquídeas, esta tecnología ha sido exitosamente aplicada para la producción comercial de orquídeas seleccionadas. Grandes cantidades de plantas de calidad, el establecimiento de nuevos híbridos y la multiplicación y conservación de germoplasma son algunos beneficios que son derivados de la aplicación de esta tecnología (Yoneo, 1991).

Las técnicas de cultivo *in vitro* tienen que ser exitosamente adaptada para la propagación masiva de plantas de orquídeas. Los resultados han sido logrados con una gran variedad de orquídeas, la mayoría focalizado en una nutrición inorgánica y con el uso de reguladores de crecimiento, entonces cada especie y género requiere una diferente composición de medio y condiciones de cultivo para su crecimiento (Hahn y Paek, 2001).

En cuanto a requerimientos comerciales y conservación de especies en peligro de extinción, esto es deseable para el establecimiento de métodos *in vitro* para la rápida y larga escala de propagación (Pedroza y Mican, 2006).

### **2.2.2. Reproducción *in vitro***

El cultivo de tejidos, micropropagación o cultivo *in vitro* es una técnica de cultivo artificial que permite producir organismos similares a partir de un explante , es decir una porción de planta (tejido, órgano,células o parte de una masa callosa) tomada para el cultivo in vitro, bajo condiciones controladas. Esta técnica nació hace cerca de 150 años cuando Saks y Knop (en 1860 y 1861) observaron que los principales nutrientes de las plantas superiores eran sustancias inorgánicas y no orgánicas como se creía desde la época de los griegos, dando origen al desarrollo del primer caldo o medio nutritivo (González, 2008).

Los pioneros en el trabajo de micropropagación fueron F. Skoog y T. Murashige, este último es considerado actualmente una autoridad en procedimientos y componentes del medio estéril para un gran número de cultivos hortícolas.

En los siguientes años, estudios sobre polaridad de las plantas (Vochting, 1898) y la primera obtención de callo (tejido vegetal que se divide activamente en el cultivo de tejidos) en segmentos de dientes de león (Rechinger, 1893) propiciaron que muchos fisiólogos vegetales iniciaran estudios de lo que se llamaría posteriormente “totipotencialidad”. Más tarde, en 1902 el fisiólogo y botánico alemán Haberland propone por primera vez el cultivo de células vegetales *in vitro* desarrollando más adelante la teoría de “totipotencialidad” razón por la cual se le considera el padre del cultivo de tejidos (González, 2008).

Toda célula vegetal viva, cualquiera que sea su “especialización”, posee un núcleo que es capaz de reproducir las características de la planta de la cual proviene. A esta notable capacidad de la célula vegetal, el cultivo *in vitro* debe toda su extensión.

En el año de 1960 en Francia, el investigador Morel realizó un interesante descubrimiento al percatarse que de la extremidad de pie de la orquídea *Cymbidium* podían proliferar una multitud de plantas (Macdonald, 2006).

La introducción de un método de germinación de semillas por Knudson (1946) y el cultivo de un fragmento de vástago por Morel (1960) ha ayudado en el desarrollo de métodos para la propagación de orquídeas (Sheelavantmath, 2000).

El establecimiento de un medio de cultivo y la selección del explante, esta definido por el resultado que se desea obtener; es decir, las técnicas que se utilizan para cultivar protoplastos, no son exactamente las mismas que se utilizan para cultivar meristemas (Roca, 1993).

El objetivo de emplear el cultivo *in vitro* es, controlar lo mejor posible el ambiente (temperatura, luz, composición del medio, pH) en el crecerá el explante que se va a cultivar con un fin de investigación o bien con el fin de multiplicación vegetativa.

Por lo tanto una efectiva estrategia llega a ser esencial para salvar y multiplicar estas especies para su conservación así como para una explotación hortícola. La propagación convencional a través de semillas es menos deseable especialmente

para la explotación hortícola debido al largo periodo juvenil previo a la floración (William *et al.*, 2003).

Se considera que es de vital importancia tomar acciones que conlleven a un manejo sustentable de las orquídeas mexicanas, entre las que se tiene el establecer sistemas de micropropagación, para conseguir la reproducción de orquídeas en forma masiva a partir de semillas o tejidos vegetativos y desarrollarlas en grandes invernaderos (Ávila y Salgado, 2006).

### **2.2.3. Reproducción a partir de semillas**

Debido a que las semillas de orquídeas son muy pequeñas y contienen poca o nula reserva alimenticia, la germinación y el subsiguiente desarrollo de la planta, dependen en la naturaleza, de la relación simbiótica con un hongo, sin embargo, es posible sustituir la acción del hongo por un medio nutritivo, a esta germinación se denomina asimbiótica (Gil, 2007).

En el caso de orquídeas raras o las que están en peligro de extinción, metodologías *in vitro* de propagación pueden ser necesarios, donde el cultivo de semillas es una razonable estrategia de propagación masiva de un muestreo no destructivo de explante (Krikorian, 1991; Zettler *et al.*, 2001).

De acuerdo a Wagner *et al.* (2006) la propagación de orquídeas se puede realizar por la germinación de semillas de forma asimbiótica o bien por la multiplicación convencional vegetativa.

También las micorrizas proveen a las plantas jóvenes de azúcares y nutrimentos que necesitan en su desarrollo hasta ser autosuficientes (McKendrick, 2000).

Las semillas requieren establecer relaciones simbióticas con microorganismos, como es el caso de un hongo específico, conocido como *Rhizoctonia*, ya que la capa de la cápsula es gruesa, la acción del hongo consiste en la degradación de dicha capa, sin que altere las células interiores y permite la germinación.

Cuando el mecanismo es asimbiótico, el proceso de germinación es distinto al anteriormente planteado. Sustituyendo la acción de los microorganismos, se necesita el uso de procesos químicos o físicos para liberar las semillas y posteriormente esterilizarlas, reconociendo que las semillas están desprovistas de nutrimentos, el paso a seguir es colocar las semillas en un medio nutritivo y estéril para proporcionarle las condiciones idóneas para el proceso de germinación (McKendric, 2000).

La germinación de la semilla en el medio de cultivo, produce una masa indiferenciada, llamada protocormo; bajo condiciones óptimas, el protocormo continuará su crecimiento por semanas, meses o incluso años, hasta alcanzar el desarrollo de raíces y hojas.

Son diversos los medios nutritivos usados para la germinación de semillas y desarrollo de varios géneros y especies de orquídeas. Las orquídeas terrestres requieren un medio pobre en sales, mientras las epífitas necesitan un medio más rico en sales (Gil, 2007).

Son diversos los trabajos realizados alrededor del mundo que evalúan procedimientos para optimizar la germinación de distintas orquídeas

La germinación *in vitro* de semillas permite un gran número de plántulas para ser producidas en un pequeño lapso de tiempo. De hecho, diversos métodos han sido reportados para la micropropagación de orquídeas (Pedroza y Mican, 2006).

#### **2.2.4. Reproducción asexual**

Se pueden reproducir las orquídeas por vía vegetativa, o sea, por partición, esquejes o meristemas (que es como se producen la mayoría de las plantas que están en el mercado). En todos estos casos estamos obteniendo clones idénticos a la planta madre.

La reproducción asexual o vegetativa se efectúa sin transferencia de material genético, se realiza tomando una parte de la planta a reproducir mediante un

instrumento de cortar y sembrando en un medio adecuado, dependiendo de la especie (Gil, 2007).

Desde Morel y Wimber, demostraron la aplicación del cultivo de tejidos como una rápida propagación clonal de orquídeas, esta tecnología fue exitosamente aplicada a la producción comercial de plantas de orquídeas seleccionadas. Grandes cantidades de plantas, establecimiento de nuevos híbridos y la multiplicación y preservación del germoplasma son algunos beneficios que derivan de la aplicación de esta tecnología (Yoneo, 1991).

Los explantes son exitosos a partir de fragmentos vegetativos, inflorescencias jóvenes, hojas y raíces. Sobre la preferencia del origen del explante es terminal o axilar de las yemas de la acción vegetativa de los brotes de las plantas superiores. El explante de yemas apicales incluye el meristemo apical con 3 a 4 nudos con la presencia de hojas jóvenes. Brotes axilares como explantes, consiste del cubo del brote adherido al nudo. Los explantes por raíces consisten de 3 a 5 mm de extensión de raíz (Yoneo, 1991).

En la reproducción a partir de meristemas se extraen células meristemáticas de la yema de crecimiento de la planta bajo condiciones ambientales estériles, su posterior multiplicación y transferencia final de las nuevas plantas. Este método es utilizado para clonar variedades destacadas por su interés botánico y calidad y floración, tal técnica presenta varias ventajas: permite multiplicar a voluntad los ejemplares de una orquídea, ya que el proceso de división puede repetirse a medida que crecen los fragmentos. Estos meristemas clonados se desarrollan en un medio nutritivo y dichos individuos presentan características idénticas a la de sus progenitores (Gil, 2007).

### 2.2.5. Medios de cultivo

Los medios nutritivos empleados en los cultivos de tejidos fueron establecidos a partir de las exigencias internas de las plantas, con modificaciones para atender las necesidades específicas *in vitro*. Así mismo varios compuestos son adicionados para suprimir las necesidades metabólicas, energéticas y estructurales de la célula ya que las mismas vías bioquímicas básicas que operan en las plantas son mantenidos en los cultivos *in vitro* (Stancato, 2008).

El medio de cultivo es el que le confiere al material vegetal los nutrimentos necesarios para su desarrollo, se define por sus propiedades químicas y físicas (Vidalie, 1976).

Los componentes del medio de cultivo se clasifican en cuatro categorías:

1. Sales minerales
2. Sustancias orgánicas
3. Reguladores de crecimiento
4. Productos naturales complejos

Los tejidos cultivados tienen necesidades específicas con respecto a los siguientes iones:  $K^+$ ,  $NO_3^-$ ,  $NH_4^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ ; los iones  $K^+$ ,  $NO_3^-$  y  $NH_4^+$  son los que ejercen influencia importante en el crecimiento de los tejidos (Vidalie, 1976), con frecuencia se añade fósforo en bajas concentraciones (Vidalie, 1976).

En lo que respecta a los micronutrimentos, se sabe que el hierro es esencial para el crecimiento tisular, que generalmente se agrega en forma de quelato (Fe-EDTA) a una concentración de 20 a 40  $mg L^{-1}$ . En el caso de otros micronutrimentos, algunos tejidos son sensibles al ácido bórico ( $H_3BO_3$ ), al manganeso y al zinc, estos elementos se introducen al medio de cultivo en concentraciones del orden de 0.02 a 0.10  $mM L^{-1}$ .

Siguiendo en la línea de micronutrientes, se desconoce o se sabe muy poco acerca de la influencia del Cu, Mo, Co, I y Na sobre el crecimiento de los tejidos; sin embargo, se agregan al medio de cultivo como medida de precaución en concentraciones bajas, del orden de 0.00003 a 0.03 mM L<sup>-1</sup>.

El uso de sustancias orgánicas como azúcares, vitaminas y aminoácidos dentro del cultivo de tejidos es importante; con respecto a los azúcares, las necesidades suelen cubrirse con concentraciones de 2 a 3%; las necesidades de vitaminas se cubren con el uso de vitaminas del grupo B, es el caso de la vitamina B1, que es esencial, presente en concentraciones de 0.1 a 10 mg L<sup>-1</sup>; en el caso del mio-inositol se encuentra presente en concentraciones de 10 a 100 mg L<sup>-1</sup>, su función es mejorar el crecimiento, pero no parece ser esencial.

Con respecto a los requerimientos de aminoácidos, éstos se agregan en forma de una mezcla compleja a la que se le conoce como “caseína hidrolizada”, pero se puede adicionar asparagina, glutamina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico y tirosina, solos o mezclados. Se deben usar los isómeros L, los isómeros D son ineficaces.

Los tejidos muestran necesidades específicas en lo que se refiere a los reguladores del crecimiento o “fitohormonas”, se ha demostrado que a concentraciones bajas (0.01 mg L<sup>-1</sup>), influyen de manera sensible en el crecimiento de los tejidos vegetales.

En los medios de cultivo se utilizan cuatro citocininas: 2- isopenteniladenina (2iP) y la zeatina, que son naturales; y la N6 – benciladenina (BA o BAP) y la cinetina (6 furfuryl- aminopurina), que son sintéticas. El caso de la cinetina resulta ser menos eficiente si se le compara con las otras tres citocininas. Las concentraciones más usadas de los reguladores de crecimiento descritos es de 0.01 a 10 mg L<sup>-1</sup>.

El uso de giberelinas es recurrente, pero sólo el ácido giberélico 3 (AG3), se utiliza en forma frecuente, se adiciona en el medio de cultivo para estimular el crecimiento de los meristemos, inducir el alargamiento de los tallos o incluso para activar el crecimiento de los embriones somáticos (Vidalie, 1976).

El metabolismo de los tejidos se puede modificar por completo, dependiendo de que se encuentren en un medio sólido o en uno líquido, la decisión acerca de qué tipo de medio elegir, no tiene que ser una decisión arbitraria (Vidalie, 1976).

El pH del medio también se considera como un factor crítico. En la práctica el pH inicial se ajusta a valores comprendidos entre 5.5 y 5.8 durante la preparación del medio, durante el proceso el pH frecuentemente disminuye; sin embargo, se sabe muy poco sobre los efectos de esta variación.

Aunque en muchos casos la composición mineral de Murashige y Skoog (1962) da resultados satisfactorios, se debe considerar que no siempre es la mejor opción, lo conveniente es seleccionar una composición en función del conocimiento de la fisiología de la especie con respecto a la nutrición mineral. El medio MS es muy rico en sales totales y a menudo se le puede diluir a la mitad.

La formulación de medios exitosos para el crecimiento de orquídeas *in vitro* es relativamente simple. Muchos se presentan en un apéndice de un libro escrito por Arditti. Dos de los medios que más se usan son Knudson C y Vacin y Went los cuales son adicionados con reguladores de crecimiento y aditivos orgánicos (Yoneo, 1991).

No obstante, los resultados que se puedan obtener para una especie de orquídea con un medio específico, generalmente no se aplica a otras especies de orquídeas.

Las técnicas biotecnológicas, en la actualidad han tomado mayor auge, sin embargo hasta el momento para muchas especies vegetales, los sistemas de propagación tradicional no satisfacen las diversas demandas de estos cultivos, al igual que existen especies endémicas y/o en peligro de extinción, que como vía alternativa para su rescate y conservación no logran satisfacer las demandas de conservación y propagación (Rosales *et al.*, 2003).

Con el afán de buscar nuevas alternativas a los retos que se presentan en la conservación y propagación de orquídeas, el uso de técnicas sistematizadas se presenta en el escenario científico.

En el año 1997, surgió el denominado Sistema de Inmersión temporal, creado en el CIRAD de Francia, este sistema, se logró a partir de la aplicación de un flujo de aire a uno de sus frascos, el cual hacía subir el medio de cultivo y luego de bañar los explantes, el medio descendía por gravedad (Rosales *et al.*, 2003).

Con este método se logra una mayor tasa de multiplicación, enraizamiento y aclimatación así como niveles elevados de supervivencia a nivel de campo.

Stancato (2008) confirma que el uso de pulpas de frutos tales como: manzana, plátano y tomate, reportaron mejores resultados en el desarrollo de orquídeas epífitas de Brasil (*Laelia longipes*, *L. tenebrosa* y *Miltonia spectabilis*) que con el uso de medios tradicionales en el cultivo de tejidos (MS, Knudson y Vacin y Went). Sin embargo, el éxito en el desarrollo de una especie vegetal no se define exclusivamente por el uso adecuado de un medio.

Rodríguez (2005) reporta en su trabajo con orquídeas endémicas de Cuba que los elementos con mayor incidencia en la obtención de plántulas fueron: cápsulas maduras, medio de cultivo en estado líquido para la germinación de las semillas y carbón activado a razón de 0.15%. No obstante, existen trabajos que reportan el uso de medios tradicionales con resultados en la propagación de orquídeas.

## **2.2.6. Medios de cultivo alternativos en la propagación de *Laelia anceps***

### **2.2.6.1. Bonote de coco**

Se refiere a la fibra de coco y al polvo de coco extraídos de la cáscara de éste, mediante un proceso de humedecimiento o por medio del descortezado mecánico. Este sustrato contiene de 0.4 a 0.6% de N, hasta 0.15% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 2.0-2.5% de K<sub>2</sub>O

y una densidad aparente que oscila de 0.25 a 0.5 g cm<sup>-3</sup>. Es un sustrato potencial para biofertilizantes (BURES PROFESIONAL, 2009).

El polvo de coco se genera cuando se extrae la fibra del fruto. El polvo de coco no humedecido contiene 30% de lignina, 22% de celulosa, 11.9% de humedad y 26% de C orgánico. De los nutrimentos esenciales para las plantas, éste contiene 0.2% de N, 0.08% de P, 0.8% de K, 0.2% de S, 0.9% de Ca y 0.7% de Mg. El uso directo del polvo de coco no humedecido no es muy recomendable, puesto que en algunos casos, este contiene entre un 8 y 12% de fenoles solubles relacionados con taninos, que pueden actuar como inhibidores de las plantas y los microorganismos, además de inmovilizar el N del suelo. El polvo de coco degradado o sometido a composta, ha sido en cambio reciclado de manera efectiva en la agricultura y se han señalado los efectos benéficos sobre los rendimientos de los cultivos y las propiedades físicas del suelo (BURES PROFESIONAL, 2009).

La fibra de coco es una materia prima para elaborar sustratos alternativos a los tradicionales que destaca por su elevada estabilidad y su capacidad de retención de agua, así como una buena aireación. Las propiedades de este sustrato se muestran en el **Cuadro 8**.

**Cuadro 8.** Principales características químicas de fibra de coco (BURES PROFESIONAL, 2009).

<b>Parámetro</b>	<b>Unidad</b>	<b>Valor</b>
pH	-	5
Conductividad eléctrica	dS m <sup>-1</sup>	3.74
Nitrógeno total	%	0.51
Fósforo total, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	%	0.20
Potasio total, K <sub>2</sub> O	%	0.60
Calcio total, CaO	%	1.40
Magnesio total, MgO	%	0.20
Sodio total, NaO	%	0.187
Hierro total, Fe	%	0.206

El pH de la fibra de coco es de 5. La capacidad de intercambio catiónico es elevada, hecho que le confiere un alto poder tampón en fertirrigación. Posee una textura microalveolar y una porosidad próxima al 96%, comparable a la lana de roca, también utilizada para cultivo hidropónico. La fibra de coco utilizada como componente de sustratos a base de turba proporciona una alta capacidad de retención de agua, una elevada aireación del sistema radicular, así como una gran estabilidad de los valores de pH y conductividad eléctrica (CE) del medio. Su capacidad de retención de agua permite establecer frecuencias y dosis de fertirrigación. La fibra de coco retiene las soluciones nutritivas por capilaridad y en consecuencia son fácilmente asimilables por las plantas. Al mismo tiempo, por su estructura tiene una elevada aireación, característica que favorece el desarrollo radicular (BURES PROFESIONAL, 2009).

La fibra de coco es un material muy rico en carbono C/N =100, lo que le otorga una gran resistencia a la degradación, así como una gran estabilidad. Además de componente de sustratos de cultivo en contenedor y en cultivo hidropónico, puede ser empleada para otras muchas funciones. Algunas de ellas son su utilización como enmienda orgánica del suelo de muy lenta degradación y como drenaje, para evitar la colmatación de suelos problemáticos (BURES PROFESIONAL, 2009).

#### **2.2.6.2. Promix**

Es un sustrato de cultivo a base de turba de *Sphagnum*. La textura fibrosa de la turba utilizada favorece el crecimiento rápido de las raíces y permite mantener un óptimo equilibrio aire/agua. Además, la adición de un agente humectante favorece la absorción y la difusión del agua.

*Sphagnum* es el género más abundante dentro de las briófitas, teniendo una importancia considerable para la ecología y economía mundial (Buxton, 1996). Probablemente hay cerca de 150 especies reconocibles; sin embargo, han sido descritas más de 300 (Schofield, 1985 citado por Tapia, 2008). *Sphagnum* está distribuido a través de todo el mundo y se extiende con mayor abundancia en la porción templada fría del Hemisferio Norte, donde es la vegetación dominante de los humedales (Schofield, 1985 citado por Tapia, 2008). Un aspecto peculiar de los musgos del género *Sphagnum* es la baja tasa de descomposición del material muerto; por lo anterior, las plantas muertas se acumulan como turba. Entre las varias razones del por qué ocurre esto se encuentra la baja concentración de nitrógeno en estas plantas, comúnmente menos del 1% de la materia seca (Clymo, 1982 citado por Tapia, 2008). No sólo hay una correlación positiva entre la tasa de descomposición y la concentración de N, sino que el incremento en la concentración de nitrógeno de las plantas por fertilización incrementa la tasa de descomposición cuando las plantas mueren. La segunda razón puede ser las condiciones ácidas del medio, que son producidas por el mismo *Sphagnum*

(Clymo, 1982 citado por Tapia, 2008). Las paredes celulares de *Sphagnum* presentan una notable capacidad de absorción, siendo capaces de absorber selectivamente iones básicos y liberar iones de hidrógeno; así incrementa la acidez de su medio acuático (Schofield, 1985 citado por Tapia, 2008). La tercera razón, por la cual las tasas de descomposición son muy bajas está asociada con el ambiente permanentemente húmedo, condición que requieren la mayoría de las especies de *Sphagnum*. El contenido nutrimental del PROMIX se muestra en el **Cuadro 9**.

El pH del PROMIX oscila entre 5.5 y 6.5 (1:3, v:v en H<sub>2</sub>O); su valor de conductividad eléctrica se encuentra entre 1.3 y 2 dS m<sup>-1</sup> (Premier ProMix, 2008). La porosidad de este sustrato se encuentra en un intervalo entre 17 y 22% (del volumen); con una capacidad de retención de agua entre 700 y 900% (del peso del sustrato seco). La densidad aparente del Promix es de 0.13 a 0.16 g cm<sup>-3</sup> (Premier ProMix, 2008).

**Cuadro 9.** Contenidos de nutrimentos en Promix (Premier ProMix, 2008)

<b>Nutrimento</b>	<b>mg L<sup>-1</sup></b>
N-NO <sub>3</sub>	40 - 100
P-PO <sub>4</sub>	5 - 15
K	35 - 75
Ca	25 - 75
Mg	20 - 40
Fe	0.7 - 2
Zn	< 0.2
Cu	< 0.3
Mn	< 0.6
B	< 0.6

### 2.2.6.3. Solución nutritiva de Steiner

En los cultivos sin suelo se puede dar o establecer cualquier relación de iones y cualquier concentración total de sales, siempre que no supere los límites de precipitación para ciertas combinaciones de iones. Así, la selección de la concentración de una solución nutritiva debe ser tal que el agua y los iones totales sean absorbidos por la planta en la misma proporción en la cual están presentes en la solución (Steiner, 1968).

Steiner, desarrolló un método para calcular una fórmula para determinar la composición de una solución nutritiva, la cual satisface ciertos requerimientos. Coic (1973) y Steiner (1973, 1980) indican que la composición y concentración de una solución nutritiva depende de la clase de cultivo, de la fase de desarrollo, del medio ambiente, del tipo de hidroponía (frecuencia de renovación de soluciones). Añaden que las plantas poseen una cierta elasticidad con relación al ambiente nutritivo; es decir, que la planta absorbe los iones en su propia relación mutua, dentro de amplios límites, independientemente de la relación mutua entre los iones de la solución nutritiva (Steiner, 1961).

Steiner (1968, 1984) elaboró una solución nutritiva universal, que se distingue por sus relaciones mutuas entre aniones y cationes, expresadas en porcentaje del total de  $\text{mM}\cdot\text{L}^{-1}$ . Este autor indica que el uso de su solución nutritiva universal demanda únicamente que se determine la presión osmótica requerida para un cultivo en particular en una cierta época del año. Las relaciones mutuas entre los iones en la Solución Nutritiva Universal de Steiner en porcentaje del total de  $\text{mM}\cdot\text{L}^{-1}$  es de 60:5:35 para  $\text{NO}_3^-:\text{H}_2\text{PO}_4^-:\text{SO}_4^{2-}$  y 35:45:20 para  $\text{K}^+:\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$  (Steiner, 1968).

## 2.3 CONCLUSIONES DE LA REVISIÓN DE LITERATURA

Diversas son las especies de flora y fauna que convergen en México, producto de la ubicación geográfica de nuestro país, así como su compleja orografía e historia biogeográfica y presencia de diversos climas. En el caso de las orquídeas, se calcula que existen 400 especies o subespecies endémicas, las cuales corresponden al 40% del total registrado en nuestro país.

Relacionar la conservación de las especies con la acción del ser humano, implica una actividad de conciencia y actuar; diversas pueden ser las opciones en el acto de conservar las especies endémicas de nuestro país; la que presenta este trabajo, corresponde al acto de la investigación con fines de reproducción.

La propagación *in vitro* de material vegetal aporta resultados en la conservación de especies. No obstante, es evidente a partir de la literatura citada, que diversos son los factores que intervienen en el éxito en la propagación de germoplasma y es evidente que los resultados obtenidos dependen en gran medida de la especie con que se trabaja.

Son los medios de cultivo, el tema de investigación y es a partir de la literatura que se puede constatar, que son numerosos los investigadores dedicados a la evaluación de medios y de éste proceso surgen listas de medios convencionales, que aportan resultados específicos a una especie. El uso de Solución Steiner, fibra de coco y Promix como medio de cultivo en forma líquida, plantea la posibilidad de obtener mejores resultados en la propagación de *Laelia anceps* y a un menor costo.

### III. JUSTIFICACIÓN

El género *Laelia*, con un total de once especies, es endémico de México y se encuentra en una gran variedad de nichos ecológicos. Las distintas etnias indígenas mexicanas han cultivado tradicionalmente especies como *L. albida*, *L. anceps*, *L. gouldiana*, *L. autumnalis* y *L. furfurácea*. En la actualidad, estas especies tienen alta demanda en el mercado nacional y en consecuencia gran importancia económica; y son obtenidas de sus hábitats sin control. En forma adicional, las semillas de las orquídeas son muy pequeñas y el embrión, al carecer de suficientes reservas nutritivas, depende de relaciones simbióticas; al menos durante las etapas de germinación y de desarrollo temprano. La sobrevivencia de las plantas por semilla no siempre es exitosa.

Este proyecto de investigación evaluó el sistema de producción *in vitro* con el empleo de sustratos alternativos al medio de cultivo tradicional MS, a partir de brotes vegetativos de la orquídea *Laelia anceps*.

El objetivo será la comparación del medio MS y los medios propuestos, para determinar que medio favorece el desarrollo del material vegetal, optimiza la calidad nutrimental requerida por *Laelia anceps* y reduce los costos de producción al comparar con el medio MS.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

- Evaluar medios de cultivo alternativos al medio MS en la especie *Laelia anceps*, sobre el crecimiento y la calidad de explantes.

### 4.2. Objetivos Particulares

- Determinar el efecto de medios de cultivo alternativos, solución de Steiner, fibra de coco y Promix al medio MS sobre el crecimiento de explantes de *Laelia anceps*.
- Estimar el efecto de medios de cultivo alternativos, solución de Steiner, fibra de coco y Promix al medio MS sobre la calidad de explantes de *Laelia anceps*.

## **V. HIPÓTESIS GENERAL**

El empleo de medios de cultivo alternativos (fibra de coco, Promix y solución de Steiner), tiene un efecto positivo sobre el crecimiento y calidad de plántulas de *Laelia anceps*.

### **5.1. Hipótesis particulares**

- Medios de cultivo alternativos al medio MS inducen un mayor crecimiento en los explantes de *Laelia anceps*.
- La calidad de plántulas micropropagadas de *Laelia anceps* se incrementa con el empleo de medios de cultivo alternativos al medio MS.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Ubicación del experimento**

La presente investigación se realizó en el laboratorio del área de Nutrición Vegetal “Salvador Alcalde Blanco” del Postgrado de Edafología en el Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados.

### **6.2. Material vegetal**

Se trabajó con brotes vegetativos de *Laelia anceps* proporcionados por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, a partir de un convenio establecido con la M. en C. Lilia Rico Rodríguez, colaboradora del laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Biofísica de esa Institución.

### **6.3. Análisis químico de medios de cultivo**

El primer análisis de nutrientes solubles en los medios de cultivo se realizó antes del cultivo de los brotes de *Laelia anceps*, con el fin de determinar las concentraciones iniciales de los nutrientes en los medios de cultivo.

Los análisis posteriores se realizaron a los 20, 40 y 60 días después del inicio del cultivo. La concentración de los nutrientes P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, B y Na fueron determinados por espectrofotometría de emisión atómica de inducción con plasma acoplado (Equipo ICP-AES VARIAN™ Liberty II).

El valor de pH de los medios de cultivo se determinó directamente en él antes de realizarse el establecimiento de los explantes, así como en las fases intermedias de 20, 40 y 60 días. Para tal efecto se utilizaron 5 g de sustrato por 25 mL de agua desionizada.

En cuanto a la determinación de la CE, la metodología, fue la establecida por la Norma Oficial Mexicana NOM- 021- SEMARNAT- 2000

#### **6.4. Análisis químico de plántulas de *Laelia anceps***

La concentración de P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, B y Na, en las plántulas de un año fue determinada mediante digestión húmeda del material seco con una mezcla de ácidos perclórico y nítrico (Alcántar y Sandoval, 1999). Posteriormente, los extractos obtenidos se leyeron en un equipo de espectrofotometría de emisión atómica de inducción por plasma acoplado ICP-AES VARIAN <sup>TM</sup> Liberty II. Esta determinación se hizo a los 20,40 y 60 días después del establecimiento del cultivo.

#### **6.5. Diseño experimental y de tratamientos**

En esta investigación se evaluaron cuatro medios de cultivo en la micropropagación de *Laelia anceps*:

T1) Medio MS líquido

T2) Solución nutritiva de Steiner

T3) Fibra de coco

T4) Promix

La fibra de coco y el Promix fueron secados al aire libre y macerados en un molino de acero inoxidable y cribados con un tamiz malla 20.

Cada tratamiento constó de 45 repeticiones distribuidas completamente al azar. Las unidades experimentales consistieron de un frasco de 100 mL con medio de cultivo, malla metálica y un brote vegetativo.

## **6.6. Establecimiento del cultivo**

En el caso del medio MS se vertieron 25 mL de medio, al igual que en el tratamiento con solución de Steiner; en los tratamientos de fibra de coco y Promix, el frasco contenía 5 g de sustrato y 20 mL de agua desionizada, con lo que se obtuvo un volumen de 25 mL, todos los tratamientos se esterilizaron en autoclave (15 min a 5 atm, 120°C). Una vez estéril, cada frasco fue llevado a una campana de flujo laminar para depositar un brote vegetativo de *Laelia anceps*.

## **6.7. Condiciones de incubación**

Después de la siembra, los frascos con los explantes se incubaron a  $24 \pm 2$  °C y un fotoperíodo de 16 h luz e intensidad luminosa de  $47.3 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

## **6.8. Variables evaluadas**

### **6.8.1. Análisis químico de medios de cultivo**

En los medios de cultivo se analizó la concentración de P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, B y Na en solución; empleando un equipo de emisión atómica, de inducción con plasma acoplado (Equipo ICP-AES VARIAN™ Liberty II); leyendo directamente en el medio después de ser pasado a través de un filtro de poro medio.

Estas concentraciones fueron determinadas en los tratamientos 1 y 2 (MS y Solución de Steiner, respectivamente) en dos ocasiones: a) antes del trasplante y b) a los 20 días después del trasplante. En los tratamientos 3 y 4 (Fibra de coco y Promix, respectivamente), esta evaluación se realizó en tres ocasiones: a) antes del trasplante, b) a los 40 días después del trasplante, y d) a los 60 días después del trasplante. Lo anterior, con la finalidad de determinar variaciones de concentración causadas por el metabolismo de los explantes.

### **6.8.2. Contaminación del cultivo**

Las siguientes variables se evaluaron a los 20, 40 y 60 días:

- Porcentaje de contaminación por hongos
- Porcentaje de contaminación por bacterias
- Porcentaje de necrosis
- Porcentaje de fenolización

### **6.8.3. Variables de crecimiento**

El crecimiento de los explantes fue evaluado a los 20, 40 y 60 días durante el experimento; en cada muestreo se tomaron 15 de las 45 repeticiones por cada tratamiento para determinar las siguientes variables:

- Altura del explante
- Longitud de raíces
- Biomasa seca de la parte aérea
- Biomasa seca de raíces

### **6.8.4. Variables de calidad**

Se evaluaron las variables de calidad de explantes en intervalos de 40 días, esta programación fue modificada en función del desarrollo de los explantes y de los problemas que se presentaron.

Para los tratamientos T1 (medio MS) y T2 (solución de Steiner) se realizó sólo una evaluación a los 20 días. Los tratamientos T3 (fibra de coco) y T4 (Promix) las mediciones se hicieron a los 40 y 60 días.

- Concentración nutrimental en parte aérea y raíces de (P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn y B)
- Acumulación nutrimental en parte aérea y raíces (P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn y B). Considerando los resultados de concentración nutrimental y el peso de biomasa seca se estimó la acumulación nutrimental.

### **6.9. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el procedimiento ANOVA del programa SAS 2009 y se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia del 95%.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

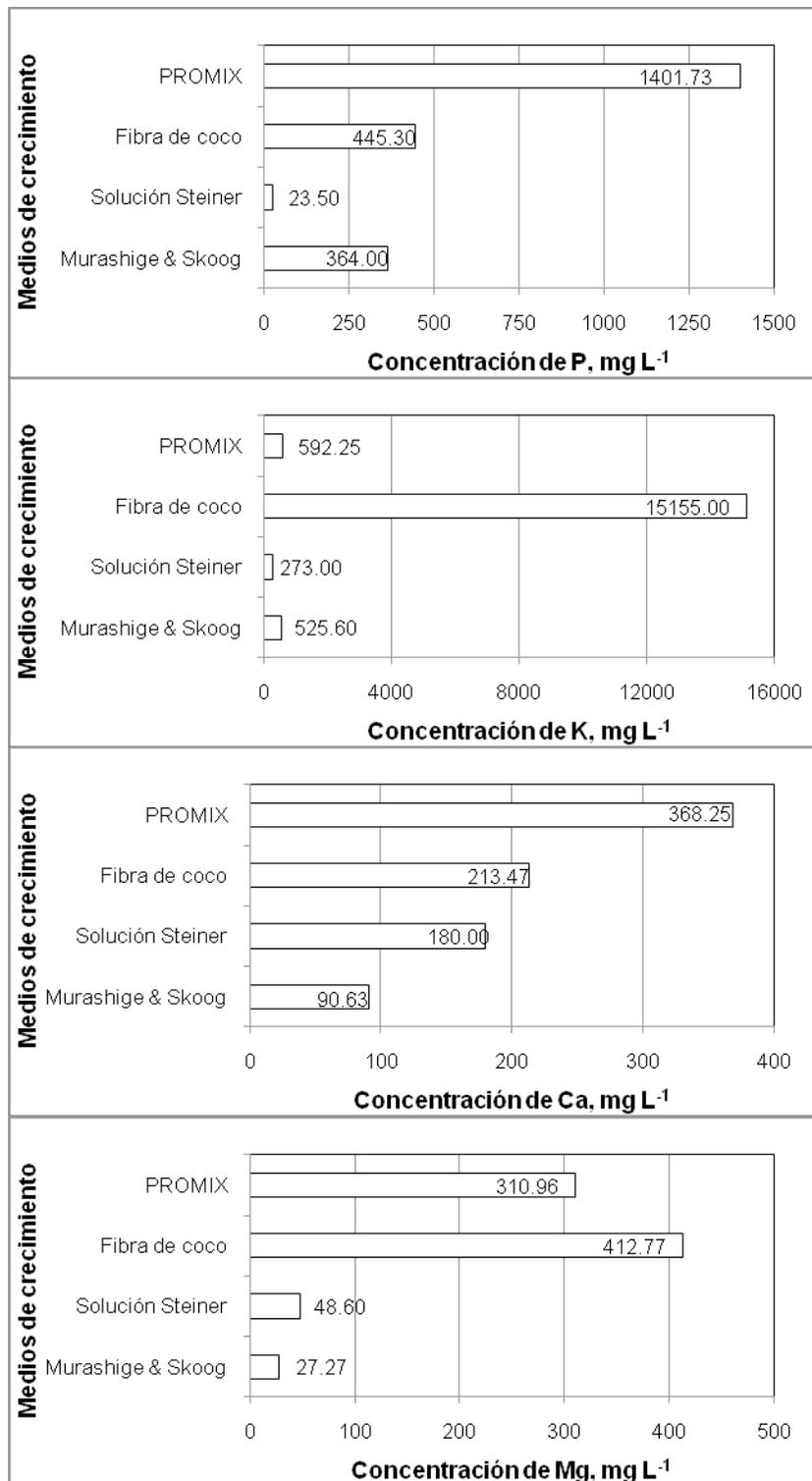
### 7.1. Concentraciones nutrimentales en los medios de crecimiento

El análisis químico de los medios de cultivo se realizó en diferentes etapas del proceso de experimentación. El primero se realizó al inicio del experimento y los subsiguientes se realizaron a los 20, 40 y 60 días después del trasplante (ddt).

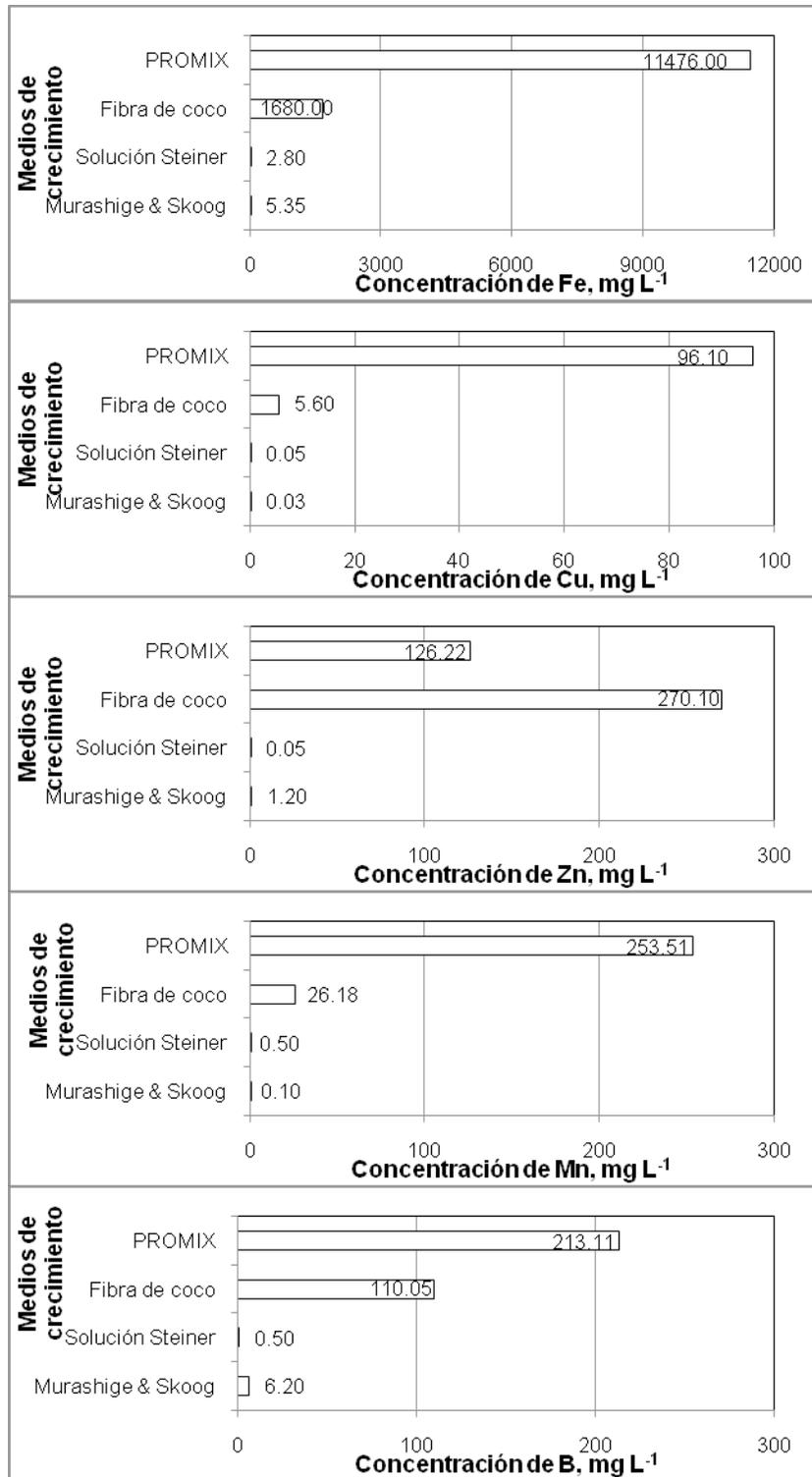
Las **Figuras 1, 2 y 3** muestran las concentraciones de macronutrientes, micronutrientes y sodio, respectivamente, de los cuatro medios de cultivo al inicio del experimento. El valor de pH inicial reportado en los tratamientos fueron: MS (5.5), solución de Steiner (5.5), fibra de coco (4.7) y Promix (5.7). De acuerdo a los resultados de concentración de medios al inicio del experimento se puede constatar que, las concentraciones de macronutrientes en los tratamientos MS y solución de Steiner (T1 y T2, respectivamente), son menores a los reportados en los tratamientos fibra de coco y Promix (T3 y T4, respectivamente). En el caso de P, donde en el tratamiento T1 se registró un valor de  $364 \text{ mg L}^{-1}$  y en el T2 de  $23.50 \text{ mg L}^{-1}$ , valores muy por debajo de T3 y T4 los cuales contenían  $445.30$  y  $1401.73 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. El mismo comportamiento se observó para K, donde los valores más bajos fueron reportados para T1 y T2 con respecto a T3 y T4, estos últimos con valores de  $15155$  y  $592.25 \text{ ppm}$  respectivamente. Con respecto a Ca, el T1 reportó un valor de  $90.63 \text{ mg L}^{-1}$  valor menor al encontrado en T2, el cual fue de  $180 \text{ mg L}^{-1}$ ; no obstante, ambos valores fueron menores al tratamiento T3 como en el T4, los cuales fueron de  $213.47$  y  $368.25 \text{ mg L}^{-1}$  respectivamente. En el caso de Mg la concentración más baja la reportó el tratamiento T1 con un valor de  $27.27 \text{ mg L}^{-1}$ , a diferencia del valor más alto que fue el del tratamiento T3 con un valor de  $412.77 \text{ mg L}^{-1}$  (**Figura 1**).

En los micronutrientes se observaron las mismas diferencias entre medios, siendo el medio de cultivo Promix el que contuvo la concentración nutrimental de todos (**Figura 2**).

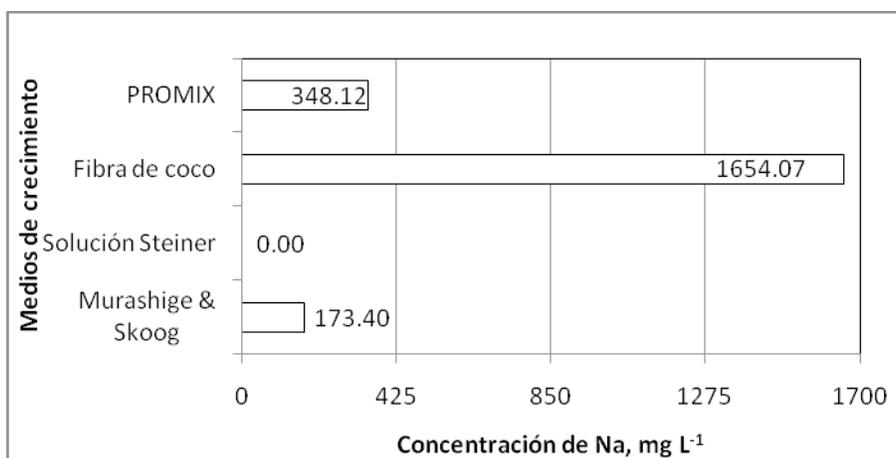
En el caso particular del Na (**Figura 3**) altas concentraciones se observan en el medio de cultivo preparado con fibra de coco (T3).



**Figura 1.** Concentración de macronutrientes en los medios de cultivo empleados para la propagación *in vitro* de *L. anceps*



**Figura 2.** Concentración de micronutrientes en los medios de cultivo empleados para la propagación *in vitro* de *L. anceps*



**Figura 3.** Concentración de sodio inicial en los medios de cultivo empleados para la propagación *in vitro* de *L. anceps*.

Los explantes establecidos en los medios T1 y T2 sólo sobrevivieron 20 días en éstos; por lo que la segunda determinación de nutrimentos en los medios de crecimiento se realizó en 20 ddt. (**Cuadro 10**). Los valores de pH de los tratamientos T1 y T2 a 20 ddt fueron de 4.7 y 4.9 respectivamente.

**Cuadro 10.** Concentración de nutrimentos en los medios de cultivo Murashige y Skoog y solución de Steiner, iniciales y a los 20 ddt.

Tratamiento	P	K	Ca	Mg	Fe mg L <sup>-1</sup>	Cu	Zn	Mn	B	Na
Murashige y Skoog	0.00	653.9	111.4	48.1	0.0	0.02	32.4	4.76	1.01	22.0
Solución de Steiner	0.00	265.1	163.9	71.2	0.0	0.01	20.5	0.09	0.39	16.2

En el caso de los resultados obtenidos al día 20 ddt, no existió una tendencia uniforme tal como ocurrió en los análisis químicos del inicio. El P no fue detectado en los tratamientos T1 y T2. En el caso de K el tratamiento T1 reportó una concentración de 653.89 mg L<sup>-1</sup>, por arriba del tratamiento T2 (265.05 mg L<sup>-1</sup>). Con respecto a Ca el tratamiento T2 reportó una mayor concentración (164 ppm) que el tratamiento T1 (111.44 mg L<sup>-1</sup>). Finalmente el Mg en el tratamiento T2 se registró a una concentración de 71.22 ppm, el cual fue mayor al encontrado en T1 (48.10 mg L<sup>-1</sup>).

En relación a la concentración de micronutrientes al día 20 se observó que para el Fe, los valores de concentración fueron iguales a cero, no así para el Cu, donde las concentraciones en los tratamientos T1 y T2 reportaron un valor menor a 0.02 mg L<sup>-1</sup>. Para el caso de Zn, ambos tratamientos reportaron una concentración mayor; 32.36 mg L<sup>-1</sup> en el caso del tratamiento T1 y 20.54 mg L<sup>-1</sup> en el caso del tratamiento T2. Para Mn el tratamiento que reportó valores de concentración bajos, fue T2 con 0.09 mg L<sup>-1</sup>, en tanto que T1 tuvo 4.76 mg L<sup>-1</sup>. Para B, el tratamiento T1 reportó el valor más alto de concentración con 1.01 mg L<sup>-1</sup>, siendo el tratamiento T2 el que mostró mayor abatimiento de la concentración de éste elemento con un valor de concentración de 0.39 mg L<sup>-1</sup>, finalmente, para Na, los valores reportados en T1 y T2 fueron de 22.02 y 16.21 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Los resultados de concentración de los medios T3 y T4, determinada a los 40 y 60 ddt se muestran en el **Cuadro 11**. Los valores de pH reportados a 40 ddt fueron de 4.2 en medio de fibra de coco y 5.1 para Promix, posteriormente a 60 ddt los valores de pH de T3 y T4 fueron de 3.9 y 4.8 respectivamente.

**Cuadro 11.** Concentración de nutrientes en los medios de cultivo fibra de coco y Promix a los 40 y 60 ddt.

Tratamiento, ddt	P	K	Ca	Mg	Fe mg L <sup>-1</sup>	Cu	Zn	Mn	B	Na
Fibra de coco, 40 ddt	399.3	8783.7	1378.4	1071.1	845.7	1.6	13.1	14.4	79.9	1609.0
Fibra de coco, 60 ddt	788.6	14154.0	205.3	270.2	10.9	4.6	263.7	2.5	18.0	1536.4
PROMIX, 40 ddt	752.5	4294.0	18362.5	17208.0	5767.3	50.7	108.9	128.5	110.4	415.2
PROMIX, 60 ddt	103.2	1056.0	635.3	399.1	6.7	5.3	91.6	3.5	6.4	446.1

En los tratamientos T3 y T4 40 ddt se observaron valores elevados en los macronutrientes, como el P, el cual reportó un valor de 399 mg L<sup>-1</sup> y 752 mg L<sup>-1</sup> respectivamente. Para K los valores fueron elevados, siendo el valor más alto, el encontrado en T3 con una concentración de 8783 mg L<sup>-1</sup>, seguido del tratamiento T4 con un valor de 4293 mg L<sup>-1</sup>. Para Ca los valores de los tratamientos T3 y T4

fueron 1378 y 18362 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. En relación al Mg, el tratamiento que reportó la menor concentración fue T3 (1071 mg L<sup>-1</sup>), a diferencia del T4 con una concentración de 17207 mg L<sup>-1</sup>. En el caso de los micronutrientes al día 40 ddt, el tratamiento que reportó las concentraciones más elevadas fue T4 y en el caso del Na el tratamiento T3 reportó un valor mayor con respecto a T4 con un valor de 1609 mg L<sup>-1</sup> (**Cuadro 11**).

Al día 60, el tratamiento T4 mostró una reducción de concentración de nutrientes con respecto a los reportados al día 40. En el caso de P, su concentración se redujo en 86 %, el K reportó una reducción en su concentración de 75%, para Ca la reducción en la concentración fue de 96.55%, y para Mg, fue de 97.68% (**Cuadro 11**).

En el caso del tratamiento T4 en los micronutrientes , el Fe reportó una reducción en concentración de 99.89%, el Cu de 89.50%, con respecto al Zn la reducción fue de 15.94% y para Mn, de 97.25%. El B, se redujo en 94.21%. En contraste, Na incrementó su concentración al día 60 (446.13 ppm) (**Cuadro 11**).

El T3, los macronutrientes reportaron reducciones significativas, para Ca, se encontró una reducción de 85.11% a los 60 días. El Mg, se redujo en 74.78%. Con respecto al P y K, las concentraciones al día 60 fueron mayores a las reportadas al día 40 (**Cuadro 11**).

Los micronutrientes reportados en el tratamiento T3 (fibra de coco) se observó que en el Fe, la reducción fue de 98.72%, para Mn, de 82.46%, para B, de 77.52%, y para Na de 4.52%. En los casos de Cu y Zn, los datos de concentración reportados al día 60 son mayores a los reportados al día 40 (**Cuadro 11**).

Las condiciones que se pueden encontrar en un medio aislado como lo es el frasco que contiene una vitroplanta, engloba diversos factores tales como luz, humedad relativa, CO<sub>2</sub> , movimiento interior del aire en el frasco y la composición

de nutrientes del medio. En ese sentido, la influencia que pueda tener cada factor sobre el desarrollo de una plántula determinará su desarrollo, sobrevivencia y posible aclimatización.

La selección de la composición mineral y orgánica de los medios nutritivos es particularmente importante para el éxito del cultivo. Para mejorar la diferenciación y óptimo crecimiento de explantes, los nutrientes deben estar presentes en el medio en cantidades suficientes a fin de garantizar su crecimiento (Moncaleán, 2003)

Por décadas la forma en que se usaba el medio de cultivo fue sólido con el uso de agentes gelificantes. Beruto (1999), afirma que las características fisicoquímicas de los medios gelificados pueden jugar un papel importante en el cultivo *in vitro*; no obstante, el uso de agentes gelificantes implica la modificación en la disponibilidad de los nutrientes así como impurezas propias de dichos agentes.

El agar es todavía uno de los agentes de solidificación más usados en medios para el cultivo de tejidos de plantas. Una gran desventaja es que el agar no es un producto estándar. Como una consecuencia, la calidad (dependiendo la marca) y la cantidad de agar usado para solidificar los medios de cultivo puede afectar el crecimiento y el desarrollo de los tejidos (Beruto, 1999).

La automatización del cultivo *in vitro* requiere reemplazar los sistemas tradicionales de agar por medios de cultivo líquido, por lo tanto, requiere una alternativa física de soporte como tapones de celulosa (cultivos vitropónicos) (Moncaleán, 2003).

Usando la misma composición del medio en este tipo de cultivos como en los cultivos solidificados provoca alteraciones morfológicas (hiperhidratación) y fisiológicas (fotosíntesis y otros intercambios gaseosos) que pueden obstruir la adaptación de las vitroplantas a condiciones *ex vitro*. Estas anomalías pueden ser

causadas por diversos factores como la alta concentración de nutrientes, particularmente  $\text{NO}_3$  (Dantas *et al.*, 2001),  $\text{Cl}_2$  (Quorin and Lepoivre, 1977),  $\text{NH}_4$  (Vieitez *et al.*, 1985),  $\text{Mg}^{2+}$  (Orlikowska, 1987) y la reducción de  $\text{K}^+$  (Pasqualetto *et al.*, 1988).

La humedad relativa en el microambiente usando medios de cultivo líquidos es muy alto (99%). Por tanto, los nutrientes del medio tradicional usados en medios líquidos fueron originalmente designados para cultivos gelificados con agar, por lo que la aplicación de nutrientes y reguladores de crecimiento pueden ser excesivos en la ausencia del efecto dispersante del agar (Moncaleán, 2003).

Por esta razón, evaluar y ajustar la concentración de nutrimentos en los medios líquidos, evitando la concentración excesiva de sales que impidan el desarrollo de las vitroplantas.

De acuerdo a este orden de ideas, si se observan los resultados obtenidos 20 ddt en los tratamientos T1 y T2, se puede considerar que, la humedad de ambos medios fue mayor a la que se pudo observar en los tratamientos T3 y T4, debido a que, en el caso de estos dos últimos tratamientos, el medio nutritivo estuvo conformado por 20 g de sustrato y 5 mL de agua destilada, a diferencia de los primeros tratamientos donde 25 mL de medio (MS en el caso del tratamiento T1 y solución de Steiner en el caso del segundo tratamiento) constituyeron la fuente de nutrientes para las plántulas de *L. anceps*.

En cuanto al uso de medios líquidos, Prasad (2009) afirma que explantes cultivados en medios líquidos de inmersión total tienen una tendencia inusual de acumulación apoplástica de agua resultando en anomalías fisiológicas y anatómicas. La hiperhidratación, afecta a las plantas haciéndolas no aptas para ser transferidas al campo.

El uso de medios líquidos ha resultado ser para diversos investigadores una opción viable de propagación de vitroplantas, utilizando materiales de soportes que permitan que el material no esté en contacto directo con el medio. Al respecto, existen diversos ejemplos de dichos materiales, como el uso de vermiculita, Sorbarod® (tapón de celulosa) y Florialite® (mezcla de vermiculita y fibra de celulosa) (Kozai, 2005).

En el presente trabajo se optó por el uso de malla metálica, como soporte que, en el caso de los tratamientos T3 y T4, el uso de dicho material de soporte permitió el desarrollo de las plántulas de *L. anceps* en los 60 días que duró el experimento, no así en el caso de las plántulas que se establecieron en los tratamientos T1 y T2, en los que al día 20 de iniciado el experimento las plantas presentaron problemas de adaptación.

## **7.2. Contaminación del cultivo**

Si bien la técnica *in vitro* tiende a asegurar condiciones de asepsia, esta es una característica difícil de mantener controlada. De acuerdo a Valenzuela (1998) la frecuencia de ocurrencia de cada fuente de contaminación varía entre laboratorios y cambia con las variaciones de estación, clima, personal, procedimientos y asepsia, entre otros. En este sentido, dentro de las variables a evaluar, la contaminación del cultivo resulta importante, en la medida que la presencia de contaminación en un medio, conduce a una disminución en la calidad del material vegetal así como su posible muerte.

Es pertinente precisar nuevamente que en los tratamientos con medio MS y con solución de Steiner (T1 y T2, respectivamente) sólo se presentan datos del primer muestreo realizado (20 ddt) debido a la muerte de las plantas, registrándose necrosis (N) en la totalidad de las repeticiones de los mismos. No se presentó contaminación por bacterias (C. B.), contaminación por hongos (C. H.) ni fenolización (F) en los tratamientos antes mencionados (**Cuadro 12**).

En los tratamientos de fibra de coco (T3) y Promix (T4) no se presentaron problemas de contaminación por bacterias (C. B.), necrosis (N) ni fenolización (F); pero si se registró en ambos, contaminación por hongos (C. H.), siendo mayor en el tratamiento con fibra de coco (T3) tanto en el primero como en el segundo muestreo (20 y 40 ddt). En el muestreo realizado a los 60 ddt no se presentó incremento en los porcentajes de contaminación por hongos (**Cuadro 12**).

**Cuadro 12.** Comparación de valores de porcentaje acumulado de contaminación entre tratamientos, a los 20, 40 y 60 ddt en *L. aniceps* cultivadas *in vitro*.

Tratamientos	20 ddt				40 ddt				60 ddt			
	<sup>1</sup> % C. H.	<sup>2</sup> % C. B.	<sup>3</sup> % N	<sup>4</sup> % F	<sup>1</sup> % C. H.	<sup>2</sup> % C. B.	<sup>3</sup> % N	<sup>4</sup> % F	<sup>1</sup> % C. H.	<sup>2</sup> % C. B.	<sup>3</sup> % N	<sup>4</sup> % F
Medio MS	0	0	100.0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Solución Steiner	0	0	100.0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Fibra de coco	20.0	0	0	0	34.81	0	0	0	34.81	0	0	0
Promix	13.3	0	0	0	24.01	0	0	0	24.01	0	0	0

<sup>1</sup>%C.H.: Porcentaje de contaminación por hongo <sup>2</sup>% C.B.: Porcentaje de contaminación por bacteria; <sup>3</sup>% N: Porcentaje de necrosis; <sup>4</sup>% F: Porcentaje de Fenolización.

Las plántulas de *L. anceps* en esta investigación, no mostraron problemas de fenolización, contrastando con lo reportado por Rodríguez *et al.* (2005), quienes afirman que, la exudación de fenoles fitotóxicos durante el cultivo de tejidos de orquídeas constituye un serio problema para el cultivo *in vitro*, y que la vía más efectiva para solucionar este problema es realizar cambios frecuentes al medio de cultivo y/o añadir carbón activado. Los resultados aquí obtenidos conducen a concluir que el uso de medios líquidos reduce o inhibe el proceso de fenolización en el cultivo *in vitro* de esta especie.

A finales del siglo pasado se propuso el uso de antibióticos en los medios de cultivo *in vitro* como una medida para asegurar las condiciones asépticas que el medio demanda. De la Rosa (1988) citando a Coriell (1979) afirma que, la incorporación de penicilina y otros antibióticos en el medio de cultivo mejoran la técnica de cultivo de tejidos. En contraposición Valenzuela (1998) afirma que, los antibióticos no destruyen a todos los microorganismos, algunos solo son suprimidos o retardan su metabolismo. Rodríguez *et al.* (1996), reportan el uso de estreptomicina, penicilina, terramicina y tobramicina en dosis de 20 mg a 1 g por litro, siendo la terramicina la que observó un control de las bacterias, aunque el crecimiento de los brotes de alcatraz *Zantedeschia* sp, fue lento.

En la presente investigación, el uso de antibióticos para mediar las condiciones de asepsia en plántulas de *L. anceps*, fue un factor a considerar a partir del uso del producto comercial Captán, fungicida que actúa en la protección y en la eliminación de microorganismos fúngicos. El grupo químico es Carboxamida y la fórmula química del Captán es 1,2,3,6- Tetrahydro- N- (trichlorometiltio) fthalimida 3<sup>a</sup>,4,7,7<sup>a</sup>- Tetrahydro- 2 ((trichlorometil)tio)-1-H-isoindol-1,3(2H)-diona C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>S y la dosis que fue aplicada por frasco que contenía 25 mL de medio, fue de 625 µL de Captán por medio.

De acuerdo a los resultados obtenidos 20 ddt, donde los tratamientos T1 y T2 no sobrevivieron, el uso de Captán no pudo ser analizado, debido a que la muerte, se debió al medio *per se* y no a problemas de contaminación. Sin embargo, en el

caso de los tratamientos T3 y T4 en la evaluación tanto del día 40 como el día 60 mostraron problemas de contaminación, pero en un porcentaje menor a 35%, incluso valores por debajo del 25% en el caso del tratamiento T4, lo que indica que, el uso de Captán en esta investigación, mejoró las condiciones de asepsia en plántulas de *L. anceps* bajo tratamiento en fibra de coco y Promix.

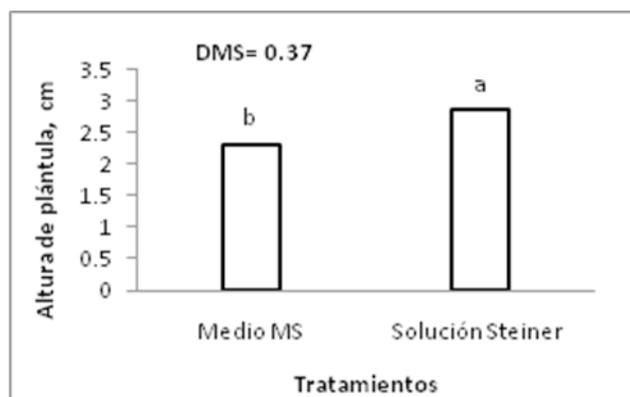
Por otro lado, el porcentaje de necrosis fue una más de las variables a evaluar, siendo en el caso de los tratamientos T1 y T2 el problema de muerte de las repeticiones. De acuerdo a los resultados obtenidos por Vidal (2007) la variable de necrosis, fue la de mayor incidencia dentro de las variables de contaminación en el proceso de germinación *in vitro* de cuatro especies de heliconias (*Heliconia bihai*, *H. collinsiana*, *H. latispatha* y *H. psittacosum*) bajo diferentes tratamientos de escarificación.

Solís (2002) en su trabajo *in vitro* con *Brassalova cucullata* L. y *Oncidium cebolleta* (Jacq.) Sw. evaluando los medios Knudson C (1964), el mismo medio en dos tratamiento más, adicionado en un tratamiento con carbón activado y plátano y en otro tratamiento sólo con carbón activado y el último tratamiento con medio Vacin y Went (1949) aborda el tema de necrosis, sin explicar a que se deba la muerte de plántulas de orquídeas, pero si habla del porcentaje, el cual alcanza un valor menor al 15%. Al respecto se puede afirmar que dichos medios se presentaron en forma gelificada, lo cual modifica la disponibilidad de las sales, factor que sin duda provocó la muerte de las plántulas de *L. anceps* bajo tratamiento T1 y T2 en este trabajo, problema que no se presentó en los tratamientos T3 y T4 tanto en el periodo 40 como el periodo 60 de evaluación, lo que indica que el problema de necrosis no se presenta en medios líquidos a base de fibra de coco y Promix.

### 7.3. Variables de crecimiento

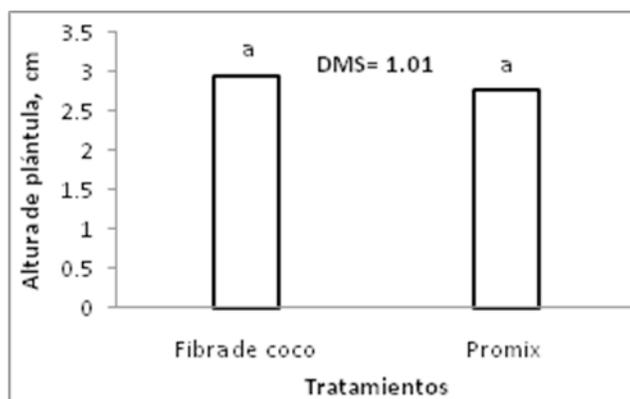
#### 7.3.1. Altura de explante

Los valores de altura de explantes después de 20 días de experimento en los tratamientos 1 y 2 (medio MS y solución de Steiner, respectivamente) reportaron diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0.05$ ). Para dicha variable, la prueba de Tukey indicó que el mejor tratamiento fue el de solución de Steiner con 2.86 cm de altura promedio en explantes, que superó a la altura de los explantes del tratamiento T2 (medio MS) en 0.55 cm, lo que representa casi el 24% (**Figura 4**). A pesar de que los explantes no sobrevivieron si hubo crecimiento en éstos en los primeros 20 ddt, dado que al inicio del experimento los explantes medían en promedio 2 cm de altura.



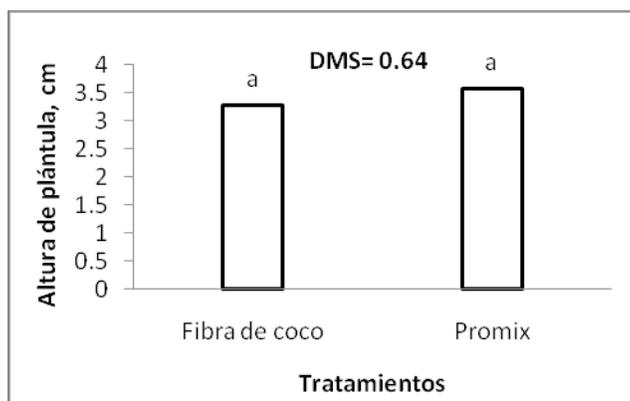
**Figura 4.** Altura de brotes de *L. anceps* establecidos en medio MS (T1) y Solución de Steiner (T2) 20 ddt. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

En la **Figura 5** se presentan los resultados obtenidos de la evaluación estadística de los tratamientos T3 y T4 a los 40 ddt. En la variable de altura de brotes, las plántulas de *L. anceps* no presentaron diferencias estadísticas significativas entre dichos tratamientos ( $p > 0.05$ ), reportando valores de 2.95 cm de altura promedio de las plántulas establecidas en el tratamiento con fibra de coco (T3) y de 2.77 cm en las plántulas bajo el tratamiento de Promix (T4).



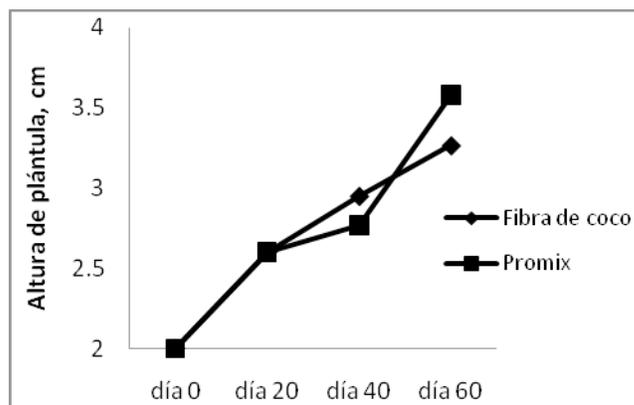
**Figura 5.** Altura de brotes de *L. anceps* establecidas en medios de cultivo: Fibra de coco (T3) y Promix (T4) 40 ddt. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

Los resultados de altura de plántulas de *L. anceps* a los 60 ddt, no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre tratamientos; dado que las plántulas del tratamiento con fibra de coco (T3) tuvieron una altura ligeramente menor (3.26 cm) a las del tratamiento con Promix (T4) (3.57 cm), como se muestra en la **Figura 6**.



**Figura 6.** Altura de brotes de *L. anceps* establecidos en medios de cultivo: fibra de coco (T3) y Promix (T4) 60 ddt. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

En la **Figura 7** se presentan la evolución presentada en la variable altura de explantes a lo largo de los 60 ddt en los tratamientos T3 y T4. Se observó en ambos una tendencia ascendente hasta el último muestreo realizado, destacándose que hasta los 20 ddt los valores de altura fueron iguales. A partir de los 40 ddt la tasa de crecimiento fue distinta entre tratamientos y al final de la evaluación se registraron los explantes más altos en el tratamiento con Promix (T4).



**Figura 7.** Crecimiento de explantes de *L. anceps* en tratamientos de fibra de coco (T3) y Promix (T4) a través del tiempo que duró el experimento.

La comparación de resultados en la variable de altura de explante, se divide en dos etapas, la primera corresponde a los resultados obtenidos en los tratamientos T1 y T2 en el día 20 ddt, resultados que muestran que el tratamiento T2 fue mejor,

reportando una diferencia de 0.55 cm con respecto al tratamiento T1 y la segunda etapa abarca los resultados obtenidos en los tratamientos T3 y T4 en los días 40 y 60 ddt, donde al día 40, el mejor tratamiento fue T3. Sin embargo al realizar el análisis estadístico, no muestra diferencias entre los tratamientos T3 y T4. Los resultados obtenidos en estos tratamientos al día 60 demuestran que las plántulas presentaron un aumento de altura de 0.31 cm en el tratamiento T3 y de 0.8 cm en el tratamiento T4, representando este último el mejor tratamiento para la variable de altura de explante.

De acuerdo a Solís (2002) la variable de altura de explante en la especie de orquídea, *Brassavola cucullata* L. propagada en cuatro distintos medios sólidos (Vacin & Went, Knudson C, Knudson C + plátano + carbón activado y Knudson C + carbón activado) presentó diferencias entre los tratamientos al realizar el análisis de varianza, donde la prueba de Tukey indicó que, el mejor tratamiento fue el medio de Knudson C más plátano y carbón activado con 1.62 cm. de altura promedio por planta, aunque este tratamiento no difiere significativamente del tratamiento del medio Knudson C más carbón activado que desarrolló 1.47 cm de altura promedio por planta. Ambos tratamientos presentaron diferencias estadísticas con el medio Vacin & Went y con el testigo (Knudson C); entre éstos últimos, el testigo generó un mayor desarrollo de planta con 0.76 cm en promedio, en comparación al presentado por el medio de Vacin & Went (0.6567). Estos resultados indicaron que el uso de materiales orgánicos en la preparación del medio de cultivo tienen efectos positivos en el crecimiento de *Brassavola cucullata*.

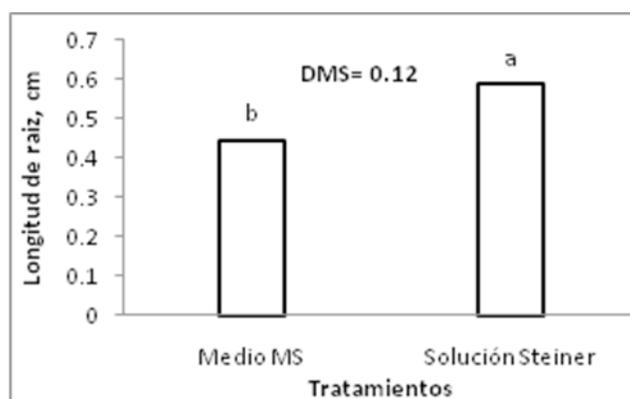
En otro estudio, do Valle Rego-Oliveira (2005) trabajó con los protocormos de dos orquídeas brasileñas *Catasetum fimbriatum* y *Cyrtopodium paranaensis*, los cuales se cultivaron en distintos medios: MS (1962), MS modificado con  $\frac{1}{2}$  macronutrientes, MS modificado con  $\frac{1}{4}$  macronutrientes, Vacin & Went (1949), Knudson C (1946), Fórmula comercial N:P:K (10:5:5) 2 mL L<sup>-1</sup> y fórmula comercial N:P:K (10:30:20) 3 g L<sup>-1</sup>. En todos los tratamientos se agregaron: 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 6 g L<sup>-1</sup> de agar. Al cabo de seis meses, los resultados indicaron que, en

ambas orquídeas, el medio MS con la mitad de sales favoreció la altura de las plántulas de orquídeas brasileñas, lo que concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación, donde los tratamientos con menor disposición de sales (T3 y T4) permitieron el desarrollo de las plántulas de *L. anceps*.

Sin embargo, los resultados de diversos trabajos con orquídeas demuestran que las respuestas observadas dependen de la especie con la cual se trabaje y es a partir de esta idea como Gómez (2004) evaluó el crecimiento de las orquídeas *Encyclia citrina*, *Oncidium cavendishianum*, *Dendrobium nobile*, *Laelia anceps* y *Epidendrum* sp, las cuales se desarrollaron en el medio MS (1962) enriquecido con sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>), carbón activado (0.05%), agar (7 g L<sup>-1</sup>) y extractos de jitomate (40 g L<sup>-1</sup>), plátano (40 g L<sup>-1</sup>), manzana (40 g L<sup>-1</sup>) y agua de coco (100 mL L<sup>-1</sup>). Si bien no se menciona la altura promedio inicial, *L. anceps* ocupó el último lugar al lograr un incremento bajo al final del experimento, pero que se comportó de forma un tanto irregular, ya que durante el primer y segundo muestreo fue superior a *Epidendrum* sp. luego disminuyó su velocidad de crecimiento y así se mantuvo hasta el final. El trabajo aporta resultados acerca de la línea de tiempo necesaria para el crecimiento de *L. anceps*, que sin duda fue menor a las otras especies evaluadas por Gómez (2004) en un periodo de evaluación de un año, con seis muestreos. Si se considera esta última observación, se podría afirmar que, el periodo de tiempo contemplada en esta investigación representó un cuarto del tiempo dispuesto por Gómez (2004), lo que indica que, en la línea de tiempo de un año, en los primeros cuatro meses la altura de *L. anceps* fue mayor a lo reportado por la misma especie al final del experimento, lo que representa que el presente trabajo se realizó durante la etapa de mayor crecimiento.

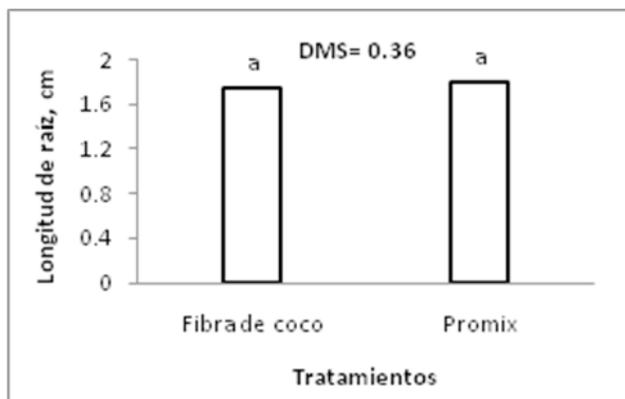
### 7.3.2. Longitud de raíces

La longitud de raíces obtenidos 20 ddt, demostraron que, en el caso de las raíces de *L. anceps* bajo tratamiento T1 fue menor al reportado en el promedio de la longitud de raíz en tratamiento T2, indicando una diferencia de 0.14 cm con respecto al primero, tal como se muestra en la **Figura 8**. Estos resultados correlacionan en forma positiva con los obtenidos en la variable altura de explante en estos tratamientos.



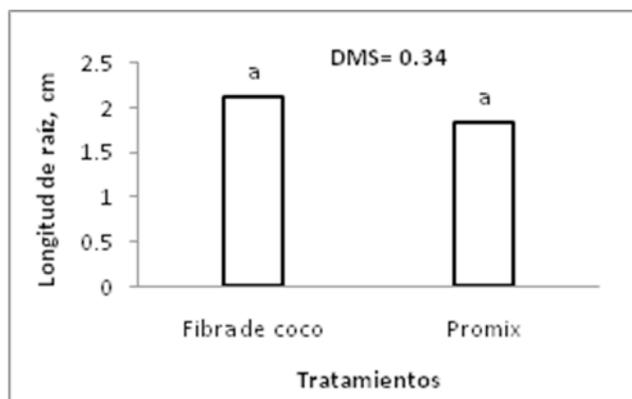
**Figura 8.** Longitud de raíces de plántulas de *L. anceps* en medios MS y solución de Steiner 20 ddt. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

La longitud promedio de raíces de *L. anceps* 40 días después de iniciado el experimento no mostró diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos de fibra de coco y Promix, 1.74 cm y 1.79 cm respectivamente, tal como se muestra en la **Figura 9**.



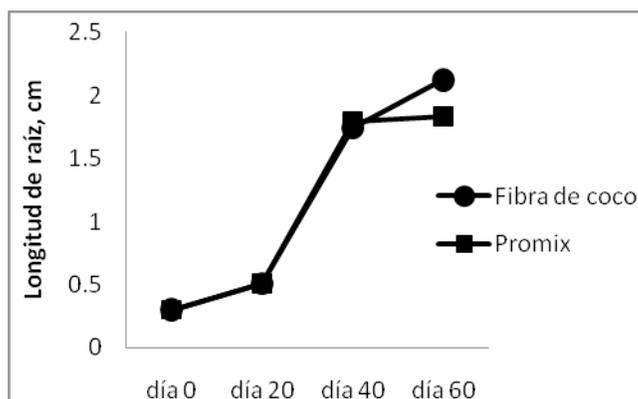
**Figura 9.** Longitud de raíces de plántulas de *L. anceps* en medios conteniendo fibra de coco y Promix a 40 ddt. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

La longitud de raíces de *L. anceps* obtenidos al día 60, no fue diferente estadísticamente entre los tratamientos T3 y. La longitud de raíz promedio de plántulas tratadas con fibra de coco fue de 2.12 cm, mientras que para las establecidas en el medio conteniendo Promix fue de 1.83 cm (**Figura 10**).



**Figura 10.** Longitud de raíces de plántulas de *L. anceps* en medios conteniendo fibra de coco y Promix a 60 ddt. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

Los resultados registrados en la variable longitud de raíz durante el experimento (**Figura 11**), permiten observar que ésta no fue afectada por los medios de crecimiento evaluados. La tendencia de crecimiento en ambos tratamientos marca una ligera diferencia (del orden de 0.28 cm), sólo en el muestreo realizado 60 ddt.



**Figura 11.** Crecimiento de raíces de *L. anceps* en medios de crecimiento con fibra de coco (T3) y Promix (T4) durante 60 ddt.

La variable evaluada en esta sección resulta de vital importancia, ya que en la medida en que la raíz se desarrolle en condiciones *in vitro*, se asegura un mayor porcentaje de sobrevivencia bajo condiciones de invernadero.

Los resultados obtenidos en raíces de *L. anceps* en los tres periodos de evaluación indican que, al día 20, el tratamiento que reportó un valor mayor fue el tratamiento T2 con un promedio de 0.58 cm con respecto al tratamiento T1 (0.44 cm).

Al día 40 En el caso de las plántulas bajo tratamiento T3 y T4 40 ddt, el tratamiento T4 reportó un valor promedio de 1.79 cm en tanto que en el tratamiento T3 el promedio fue de 1.74. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas entre ambos tratamientos.

Lo mismo ocurrió 60 ddt, donde se observaron diferencias estadísticas entre el tratamiento T3 y T4. No obstante, el tratamiento T3 obtuvo un valor promedio de 2.12 a diferencia del tratamiento T4 con un promedio de 1.83 cm.

A partir de estos resultados se puede establecer que, en la variable longitud de raíces, el tratamiento T3 reportó el promedio de mayor longitud. Sin embargo cabe destacar que, este resultado se alcanzó sólo a los 60 ddt, ya que en los resultados obtenidos al día 40 ddt el tratamiento que reportó un valor mayor fue el tratamiento T4. Cabe aclarar que la ventaja con respecto al tratamiento T3 fue tan solo de 0.05 cm, diferencia que aumenta a 0.29 cm 60 ddt.

Diversos son los trabajos que han analizado el uso de materiales que puedan sustituir el uso de un medio gelificado por materiales que permitan de alguna manera, mejorar el desarrollo de la zona radicular.

Al comparar los resultados obtenidos en esta variable con otros trabajos con orquídeas, Solís (2002) reportó una longitud de raíces de 2.38 cm en *Brassavola cucullata* L. como el promedio mayor alcanzado en medio Knudson C más plátano y más carbón activado en un periodo de seis meses de evaluación, lo cual también fue observado en la especie *Oncidium cebolleta* (Jacq) en el uso del mismo medio alcanzando el mayor promedio con un valor reportado de 1.49, a diferencia del uso del medio Knudson C con un valor promedio de 0.94 cm, todos valores obtenidos al sexto mes de evaluación. Si tomamos en cuenta la importancia de las raíces en el proceso de aclimatación, será evidente que, en el presente trabajo los promedios obtenidos a partir del día 40, son mayores a los reportados por Solís (2002) al sexto mes, lo que implica mayores posibilidades de sobrevivir.

Por otro lado, Gómez (2004) reportó que *Dendrobium nobile* fue superior a partir del cuarto muestreo (2.92 cm), seguido de *Oncidium cavendishianum* (2.28 cm) que en el quinto muestreo fue similar a *D. nobile* (3.18), quedando en segundo lugar al final del experimento *Encyclia citrina* y *L. anceps* (2.23 y 2.34 cm respectivamente), las cuales fueron estadísticamente iguales a partir del quinto muestreo y finalmente, *Epidendrum* sp (1.16 cm) fue la que tuvo la menor longitud de raíz. Todas las especies se evaluaron en un mismo medio, el MS enriquecido con sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>), carbón activado (0.05%), agar (7 g L<sup>-1</sup>) y extractos de jitomate (40 g L<sup>-1</sup>), plátano (40 g L<sup>-1</sup>), manzana (40 g L<sup>-1</sup>) y agua de coco (100 mL

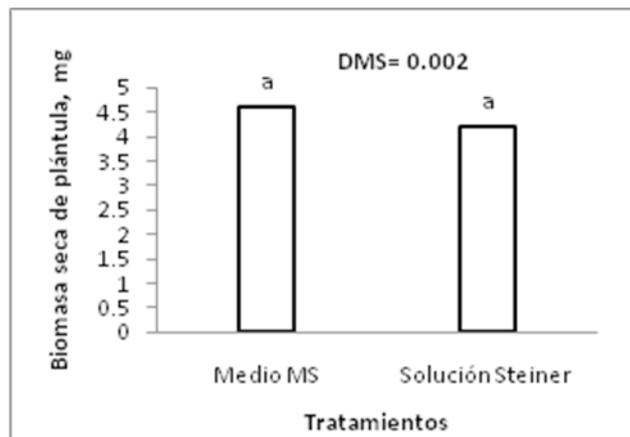
L<sup>-1</sup>) y todas las especies tenían tres meses de edad y dos hojas verdaderas en un periodo de un año de evaluación y seis muestreos.

Gómez (2004) informó que, en el sexto mes en el caso de *L. anceps*, ésta presentó un mayor crecimiento de la raíz, lo cual cambió del sexto al décimo mes en donde permaneció constante y finalmente en los últimos dos meses tuvo un incremento significativo del 45.39% al compararse con las otras especies. De acuerdo a los resultados de Gómez (2004), *L. anceps* fue de las especies con menor longitud de raíz en un periodo de 12 meses.

Si se comparan los resultados obtenidos por dicho autor con los obtenidos en esta investigación se puede afirmar que, la variable de longitud de raíz en un periodo de 60 días bajo el tratamiento T3 alcanzó un valor de 2.12 cm, valor menor al reportado en un periodo de 12 meses para la misma especie con un promedio de 2.78 cm, si bien el resultado fue menor, la diferencia es mínima en un periodo de tiempo menor.

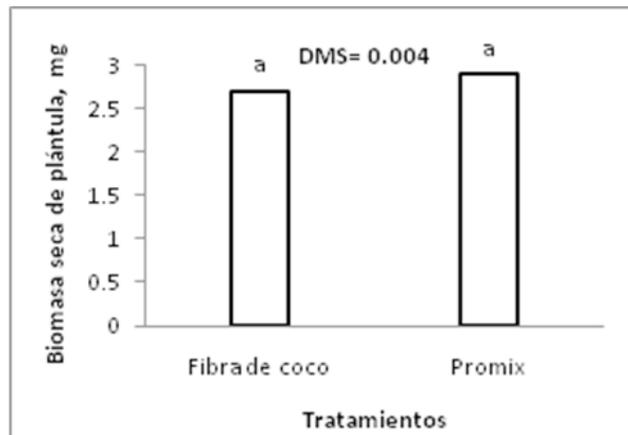
### 7.3.3. Biomasa seca de la parte aérea

Los resultados obtenidos en la variable biomasa seca parte aérea del día 20 para los tratamientos T1 y T2, no mostraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ( $P < 0.05$ ). Las plántulas de *L. anceps* que se desarrollaron en el tratamiento T1 tuvieron una biomasa peso seco total promedio de 4.6 mg, siendo mayor al valor del tratamiento T2, cuyo promedio fue de 4.2 mg, como se muestra en la **Figura 12**.



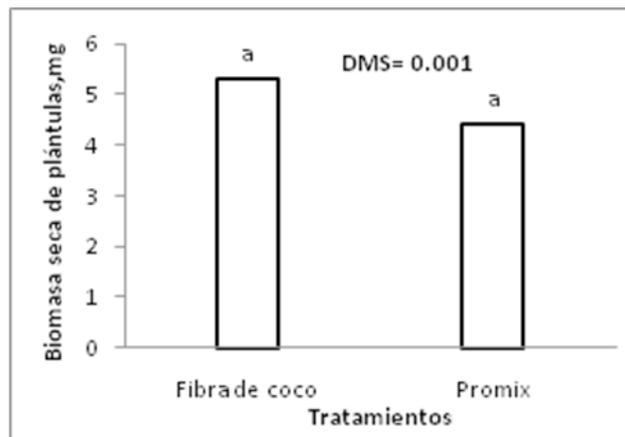
**Figura 12.** Biomasa seca total de plántulas de *L. anceps* 20 ddt. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

De acuerdo al análisis estadístico, los promedios de biomasa seca de la parte aérea de las plántulas de *L. anceps* en el día 40 después de iniciado el tratamiento, no reportó diferencias estadística. El promedio de biomasa en peso seco de la parte aérea de las plántulas establecidas en el tratamiento T3 reportó un valor de 2.7 mg, menor al reportado por el tratamiento T4 con un valor de 2.9 mg, tal como se muestra en la **Figura 13**.



**Figura 13.** Biomasa seca de parte aérea de plántulas de *L. anceps* 40 ddt. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

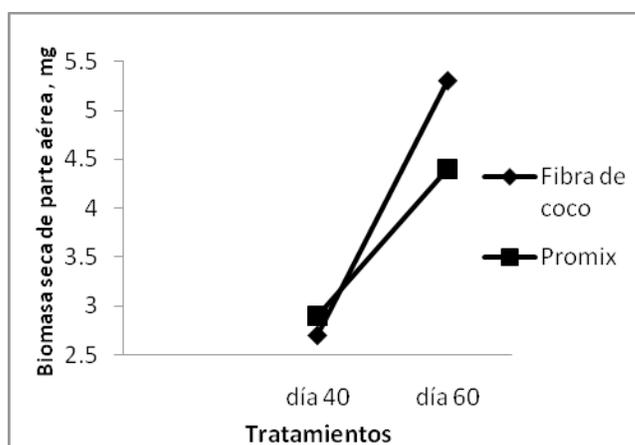
Los tratamientos T3 y T4 no presentaron diferencias estadísticas significativas a los 60 días. El peso promedio de biomasa seca en el tratamiento de fibra de coco fue de 5.3 mg, valor mayor al reportado por el tratamiento de Promix cuyo peso promedio fue de 4.4 mg. Los valores mencionados pueden observarse en la **Figura 14**.



**Figura 14.** Biomasa seca de parte aérea de plántulas de *L. anceps* 60 ddt. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

A partir de los resultados obtenidos en los días 20, 40 y 60 se observa que en el caso de los tratamientos T1 y T2 no se tuvieron diferencias estadísticas significativas, no obstante cabe destacar que el promedio obtenido corresponde a la biomasa peso seco total de las plántulas de *L. anceps*, no así en los tratamientos T3 y T4 tanto del día 20 y 40 cuyos valores, en ambos días de análisis no mostraron diferencias en promedio de peso seco de la parte aérea.

El tratamiento T3, reportó un valor mayor en relación al tratamiento T4, con una diferencia de 0.9  $\mu\text{g}$ , tal como se observa en la **Figura 15**.



**Figura 15.** Biomasa seca de parte aérea en *L. anceps* en los periodos 40 y 60 ddt.

Los valores obtenidos en esta investigación para la biomasa seca, reportó un valor bajo en los cuatro tratamientos, sin embargo, cabe destacar que, en trabajos como los reportados por Afreen-Zobayed (1999) y (2000) los sustratos fueron adicionados con medio MS, lo que convierte a materiales como la vermiculita en el soporte y no en la fuente de nutrimentos.

Como se observa en los resultados de Afreen-Zabayed (1999), muestra que los tratamientos que favorecieron el aumento en peso seco de parte aérea en papa dulce (*Ipomoea batatas* L. (Lam), cv. Beniazuma), fueron una mezcla de vermiculita y fibra de celulosa (pulpa de papel) adicionado con medio MS carente de sacarosa y agar, obteniendo un promedio de 110 mg a los 21 días de iniciado

el experimento, valor que superó al reportado por el tratamiento con medio MS carente de vitaminas, sacarosa y gelificado, cuyo valor promedio fue de 49 mg.

Por otro lado, la orquídea brasileña *Laelia longipes*, Stancato (2008) obtuvo resultados favorables en esta variable, cuando las plántulas de orquídeas se desarrollaron en medios con pulpa de plátano, con un promedio de 39 mg; no obstante, cabe destacar que los resultados provienen de tres subcultivos en un periodo de un año.

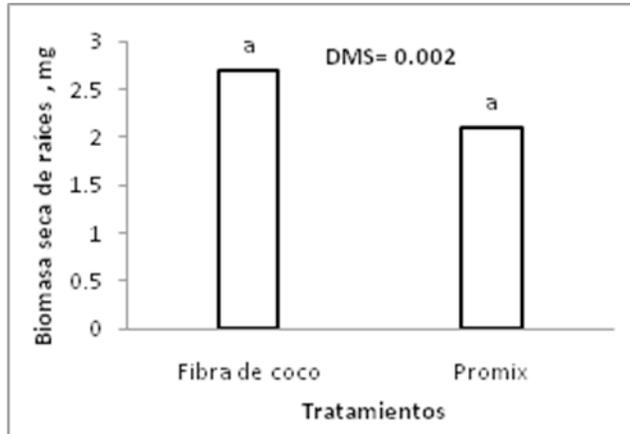
De acuerdo con Ramos (1969), el uso de pulpa de tomate en adición con vitaminas y sales minerales, estimula la germinación y crecimiento *in vitro* de especies de orquídeas epífitas y terrestres.

En la misma línea de uso de pulpas, Arditti (1982) registró un incremento de materia seca en plántulas de orquídeas epífitas de los géneros *Dendrobium*, *Phalaenopsis* y *Vanda* cuando fueron cultivadas en medios nutritivos suplementados con pulpa de manzana.

Stancato (2008) dentro del género *Laelia*, la especie *L.tenebrosa* , cultivada en medios con pulpa de plátano incorporaron mayor cantidad de materia seca, seguidas por plántulas cultivadas en medios 10:10:10 (N:P:K) que acumularon 38.7% en relación a las primeras.

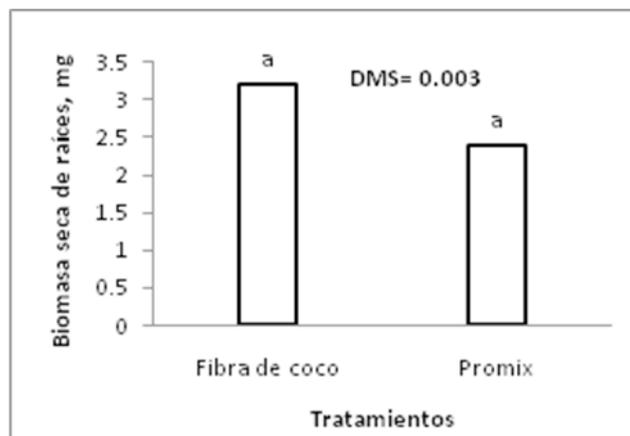
#### **7.3.4. Biomasa seca de raíces**

Para la biomasa seca en raíz, el promedio obtenido de acuerdo a la prueba de Tukey, reportó al día 40 para los tratamientos T3 y T4 no presentaron diferencias estadísticas significativas, donde el promedio de biomasa seca en plántulas de *L. anceps* en el tratamiento T3 fue de 2.7 mg a diferencia del tratamiento T4 con un promedio de 2.1 mg de biomasa seca en raíz, tal como se puede ver en la **Figura 16**.



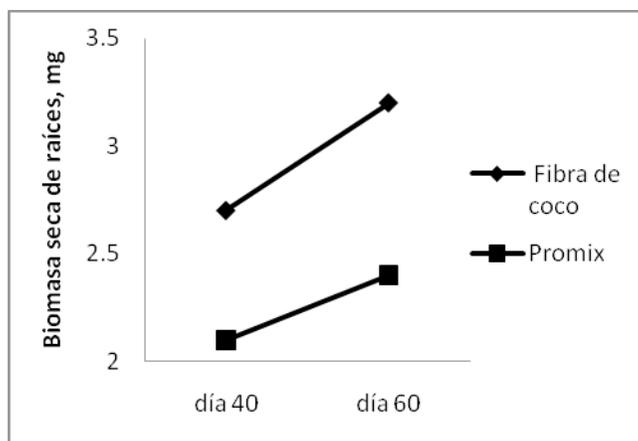
**Figura 16.** Biomasa seca de raíces de *L. anceps* en los tratamientos T3 y T4 40 ddt. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

El promedio de biomasa seca reportado en el día 60 para el tratamiento T3 fue mayor (3.2 mg) que para el tratamiento T4 (2.4 mg, tal como se muestra en la **Figura 17**.



**Figura 17.** Biomasa seca de raíces de *L. anceps* en los tratamientos T3 y T4 60 ddt. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede observar que, aunque no se presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos T3 y T4 en los días 40 y 60 del experimento, el tratamiento que generó un promedio mayor de biomasa seca en raíz de plántulas de *L. anceps* fue el tratamiento T3 (fibra de coco) con respecto al tratamiento T4 cuya diferencia se puede observar en la **Figura 18**.



**Figura 18.** Biomasa seca de raíces en plántulas de *L. anceps* a los 40 y 60 ddt.

La importancia del desarrollo radicular estriba en el éxito que posteriormente presentará la vitroplanta en su etapa de aclimatización. Acorde con esta idea Preece y Sutter (1994) reportan que, bajos porcentajes de producción de raíces de plantas y una baja fuente de humedad para la raíz son considerados como las principales causas de pérdidas de plantas durante la etapa de aclimatización.

Dentro de los resultados obtenidos por Stancato (2008) mostraron que la orquídea *Laelia longipes* reportó mejores resultados bajo el tratamiento 10:10:10 (N:P:K), con un promedio de 31.6 mg. Sin embargo, en el caso de la orquídea *Miltonia spectabilis* el mejor tratamiento en un periodo de un año de evaluación fue 10:30:20 (N:P:K) con un promedio de 46.6 mg. En ambas especies de orquídeas, los resultados obtenidos en los tratamientos mencionados, sobrepasaron los resultados obtenidos por plántulas establecidas en medios con pulpas tanto de

plátano como manzana y tomate, resaltando el uso de tres subcultivos en un periodo de un año.

En comparación con los resultados obtenidos en la propagación de *L. anceps* expuestos en la presente investigación, se puede observar que en el caso del día 40 y 60, las plántulas tuvieron valores menores a los obtenidos por Stancato (2008) a un año de evaluación. Sin embargo los promedios obtenidos en plántulas de *L. anceps* fueron mayores a los obtenidos en la orquídea *Miltonia spectabilis*, en medio MS, con un promedio de 1.26 mg, en tan solo 60 días de experimentación.

En la comparación de medios para la propagación de papa dulce (*Ipomoea batatas* L. (Lam), cv. Beniazuma), Afreen-Zobayed (1999) comprobó que el mejor medio para el peso seco fue aquel que se compuso de una mezcla de vermiculita y fibra de celulosa (7.3 g peso seco de vermiculita y 9.0 g en fibra de celulosa) con un promedio de 110 mg biomasa peso seco, valor que superó al promedio de peso seco de las plántulas de papa dulce obtenido en medios MS con agar, cuyo valor alcanzó 50 mg al día 21 de iniciado el periodo de experimentación.

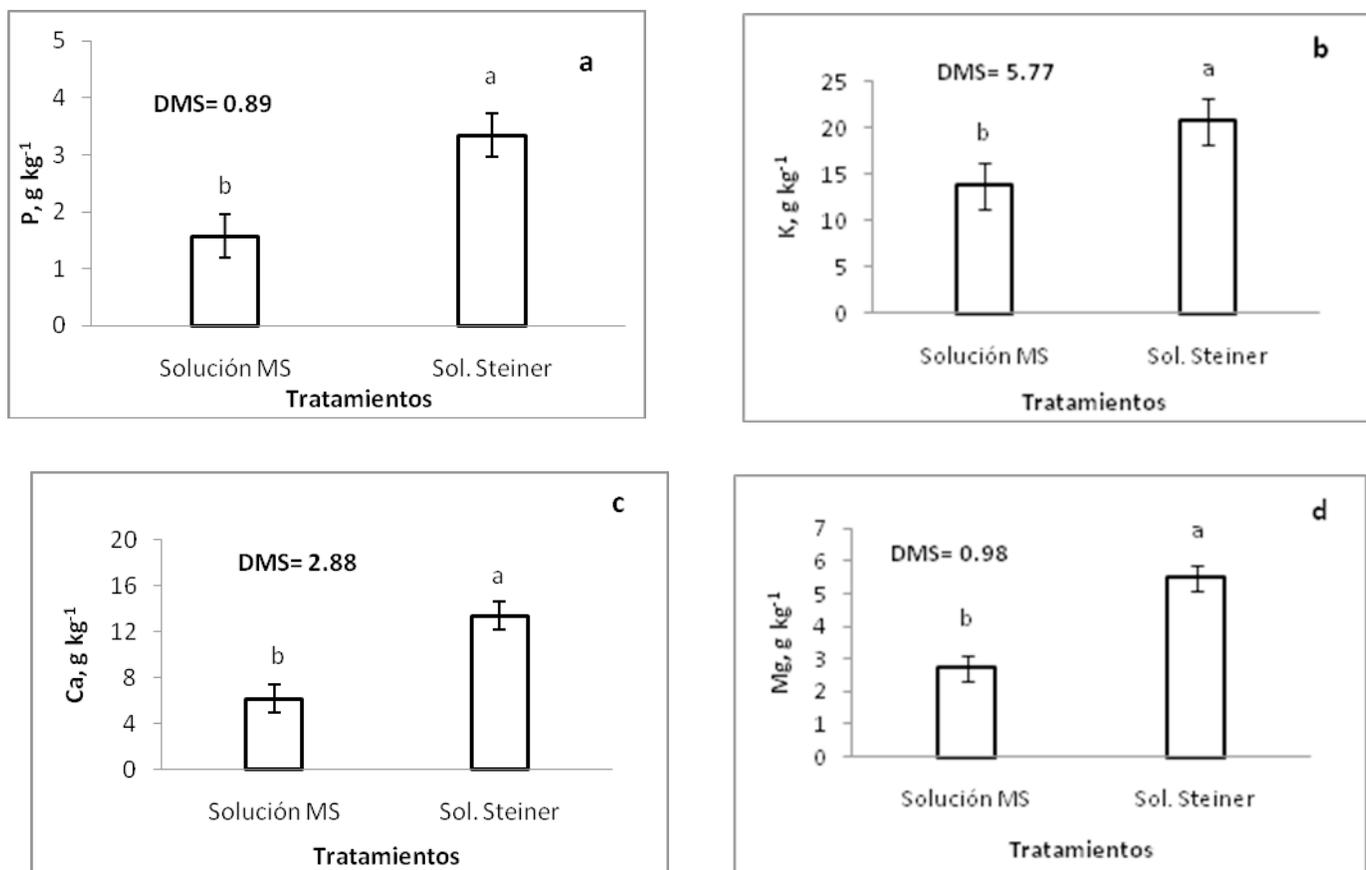
De acuerdo a Afreen-Zobayed (2000) la naturaleza del material de soporte para enraizar ejerce una considerable influencia sobre el crecimiento y calidad de las plantas *in vitro*. Afirma que el desarrollo de raíz y tallo son interdependientes, y que el pobre desarrollo de raíz eventualmente afectará el desarrollo de tallo.

## **7.4. Variables de calidad**

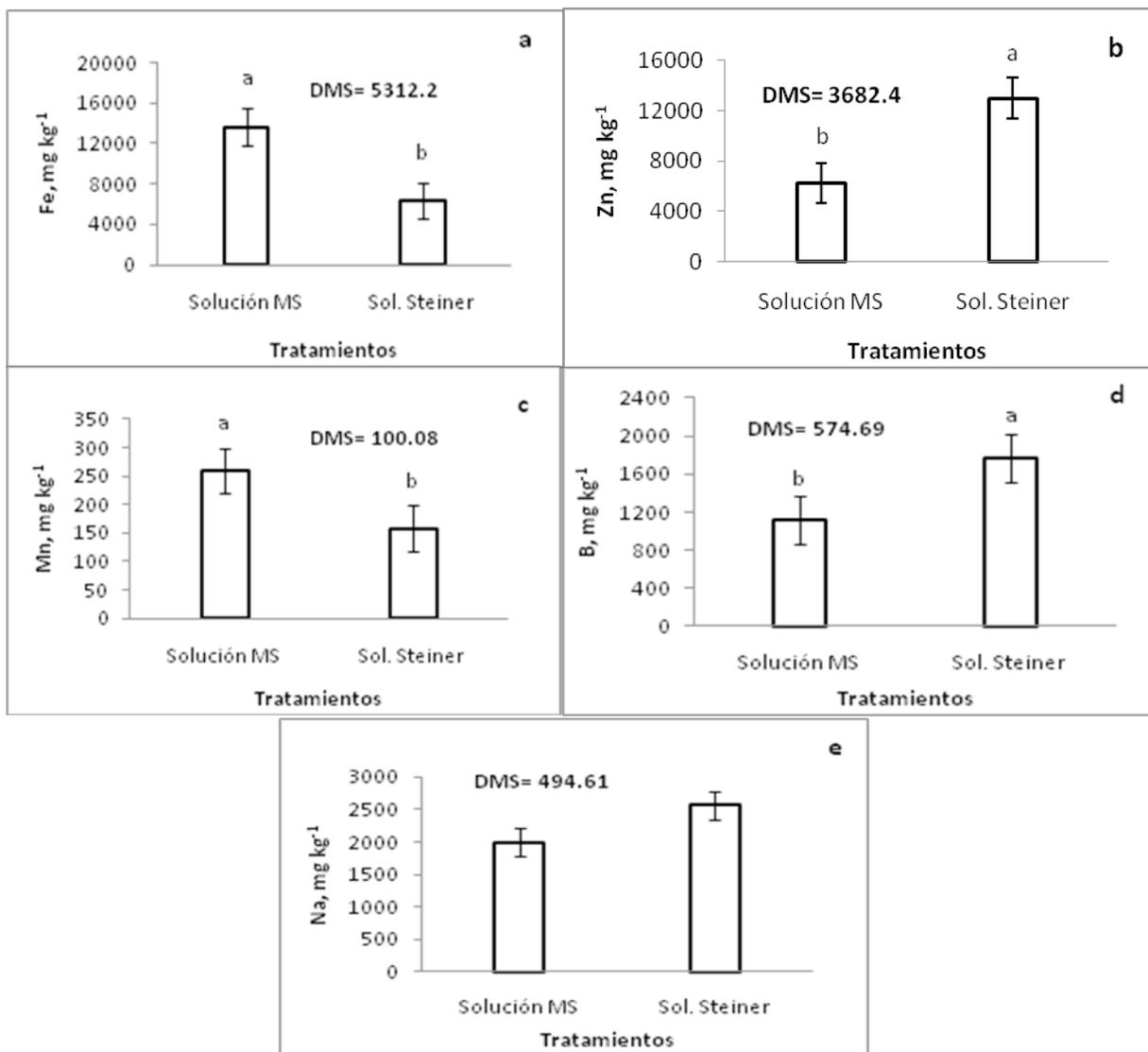
### **7.4.1. Concentración nutrimental en parte aérea**

En el muestreo realizado 20 ddt, las plántulas de *L. anceps* bajo los tratamientos T1 y T2 (medio MS y solución de Steiner) fueron evaluadas de forma completa, no así en el caso de los resultados obtenidos en el día 40 y 60, en donde la variable de concentración nutrimental se dividió en parte aérea y raíz.

Los análisis estadísticos revelaron diferencias significativas entre tratamientos en la concentración de los nutrientes P, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, B y Na (**Figura 19**). El Cu, fue el único nutriente que no presentó diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento T1 y T2, pero cabe destacar que, en el tratamiento T1, la concentración de Cu reportó un valor de  $39 \text{ g kg}^{-1}$  a diferencia del tratamiento T2 cuyo valor promedio se estimó en  $52 \text{ g kg}^{-1}$  (**Cuadro 13**).



**Figura 19.** Concentración de los macronutrientes: (a) fósforo, (b) potasio, (c) calcio y (d) magnesio en plántulas de *L. anceps* 20 ddt con los medios de cultivos MS y solución de Steiner. Letras distintas sobre las barras en cada subfigura indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).



**Figura 20.** Concentración de los micronutrientos: (a) hierro, (b) zinc, (c) manganeso, (d) boro y (e) sodio en explantes de *L. anceps* después de 20 ddt con los medios de cultivos MS y solución de Steiner. Letras distintas sobre las barras en cada subfigura indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

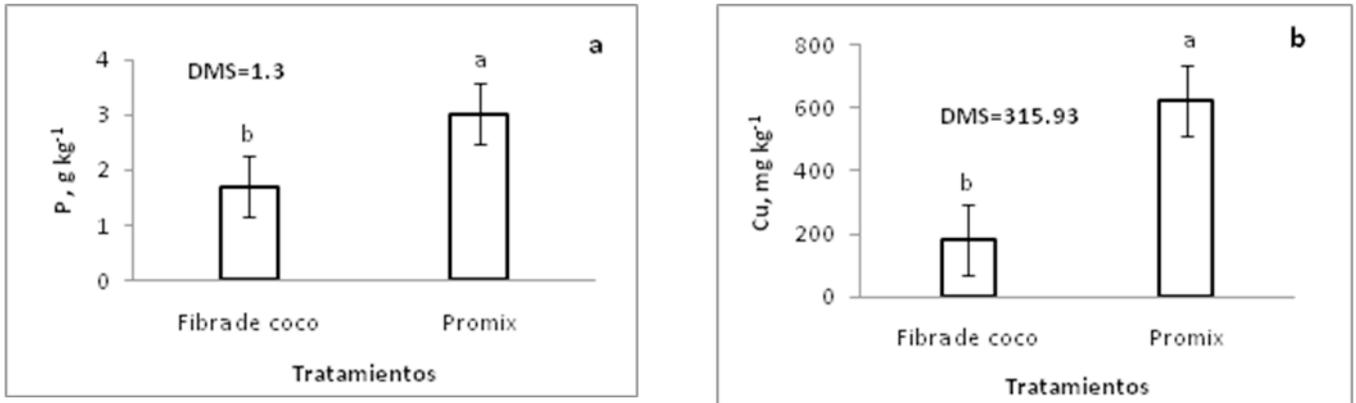
**Cuadro 13.** Concentración nutrimental en plántulas de *L. anceps* a los 20 ddt.

Nutriente	Medio MS (T1)	Solución Steiner (T2)	Diferencia mínima significativa (DMS)
Cu, $\text{g kg}^{-1}$	39.63 ± 2.90	52.33 ± 8.90	15

De acuerdo a los resultados obtenidos de la prueba de Tukey al día 40 de iniciado el experimento, hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos T3 y T4 en la concentración de nutrimentos en la parte aérea de plántulas, sólo en el caso de los nutrimentos P y Cu. El P reportó un promedio de 3.02 g kg<sup>-1</sup> bajo tratamiento T4 y un promedio de 1.07 g kg<sup>-1</sup> para el tratamiento T3. En el caso del Cu el tratamiento T3 reportó un promedio de 182 mg kg<sup>-1</sup> y en el caso del tratamiento T4 un promedio de 626 mg kg<sup>-1</sup>, ambos valores, tanto de P como de Cu, se pueden observar en la **Figura 21**. Aquellos valores que no presentaron diferencia estadística se observan en el **Cuadro 14**.

**Cuadro 14.** Concentración nutrimental en parte aérea de plántulas de *L. anceps* 40 ddt.

<b>Nutrimentos</b>	<b>Fibra de coco(T3)</b>	<b>Promix (T4)</b>	<b>Diferencia mínima significativa (DMS)</b>
K, g kg <sup>-1</sup>	39.77 ± 26.55	26.13 ± 0.97	43
Ca, g kg <sup>-1</sup>	15.40 ± 1.42	17.40 ± 2.32	4.36
Mg, g kg <sup>-1</sup>	10.17 ± 0.81	9.83 ± 0.90	1.95
Fe, mg kg <sup>-1</sup>	8232.57 ± 6635.56	3704.87 ± 311.70	10648
Zn, mg kg <sup>-1</sup>	4724.56 ± 3910.03	3020.13 ± 799.85	6397.5
Mn, mg kg <sup>-1</sup>	267.02 ± 142.39	478.9 ± 55.51	244.99
B, mg kg <sup>-1</sup>	6905 ± 5525.28	7695 ± 29.75	8857.1
Na, mg kg <sup>-1</sup>	10786.08 ± 2176.96	7689.43 ± 328.85	3529.2

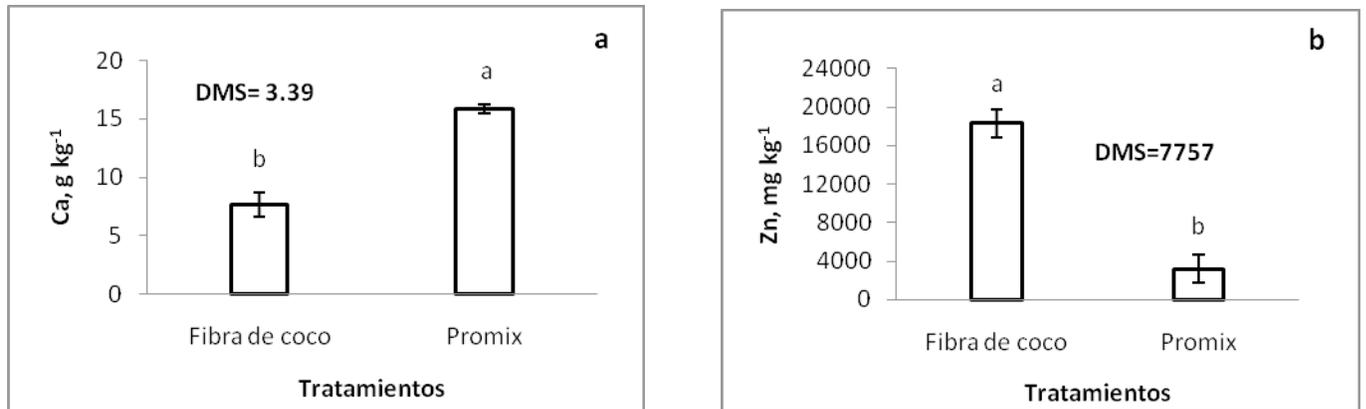


**Figura 21.** Concentración de (a) fósforo y (b) cobre en parte aérea de plántulas de *L. anceps* 40 ddt con los medios de fibra de coco y Promix. Letras distintas sobre las barras en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

La concentración nutrimental reportada entre los tratamientos T3 y T4 en la parte aérea de las plántulas de *L. anceps* 60 ddt, indicó diferencias estadísticas para los nutrimentos Ca y Zn. Los nutrimentos sin diferencias estadísticas entre tratamientos, el Ca bajo tratamiento T4 fue el que reportó una mayor concentración nutrimental en parte aérea con un promedio de  $15.8 \text{ g kg}^{-1}$  respecto al tratamiento T3 con un promedio de  $7.68 \text{ g kg}^{-1}$ . Para el Zn el tratamiento con menor concentración nutrimental en parte aérea fue el T4 con un promedio de  $3190 \text{ mg kg}^{-1}$  respecto al tratamiento T3 con un promedio reportado en  $18320 \text{ mg kg}^{-1}$  (**Figura 22**). No así en el caso de los nutrimentos P, K, Mg, Fe, Mn, B y Na cuyos valores de acuerdo a la prueba de Tukey, no reportaron diferencias estadísticas entre tratamientos y son datos que se pueden observar en el **Cuadro 15**.

**Cuadro 15.** Concentración nutrimental en parte aérea en *L. anceps* 60 ddt.

<b>Nutrientos</b>	<b>Fibra de coco(T3)</b>	<b>Promix (T4)</b>	<b>Diferencia mínima significativa (DMS)</b>
P, g kg <sup>-1</sup>	2.04 ± 0.34	2.04 ± 0.11	1.08
K, g kg <sup>-1</sup>	51.56 ± 18.66	22.63 ± 4.32	58.25
Mg, g kg <sup>-1</sup>	5.14 ± 3.43	10.14 ± 0.84	10.76
Fe, mg kg <sup>-1</sup>	7057.3 ± 239.35	6647.8 ± 478.64	1628.2
Mn, mg kg <sup>-1</sup>	316.51 ± 35.53	225.81 ± 32.60	146.72
B, mg kg <sup>-1</sup>	4903.3 ± 723.16	5751.6 ± 208.25	2289.6
Na, mg kg <sup>-1</sup>	7225.6 ± 122.26	7601.8 ± 862.10	2649.1



**Figura 22.** Concentración de (a) calcio y (b) zinc en parte aérea de plántulas de *L. anceps* después de 60 ddt con los medios de cultivos fibra de coco (T3) y Promix (T4). Letras distintas sobre las barras en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

La composición mineral en el medio de cultivo resulta ser un factor determinante en la morfogénesis de un cultivo *in vitro*, sin olvidar el papel que tienen las fitohormonas en dicho proceso. De acuerdo a Ramage (2002) los niveles de citoquininas y auxinas son determinantes en la inducción de callos, formación de órganos y multiplicación.

Con respecto al fósforo, Lee y DeFossard (1977) hablan del impacto del elemento con respecto al crecimiento del explante así como en su morfogénesis. Así también, Ramage (1999) afirma que el fósforo es rápidamente consumido por cultivos en suspensión de tabaco y puede ser considerado como un elemento limitante en diversos cultivos. El autor demostró que, el fosfato es rápidamente consumido para la formación de tallos pero no en la formación de explantes nódulo-tallo correspondiendo ambos la iniciación y crecimiento de tallos en formación. Alrededor del 50% del *pool* de fósforo fue consumido en el día 20 del experimento, durante la iniciación meristemática del cultivo, indicando que este proceso requiere fuentes altas de energía; y el restante 50% del *pool* de fósforo fue consumido dentro de los siguientes 15 días. El máximo número de tallos fue

obtenido con concentraciones de fósforo en los niveles estándares de medio MS (1.25 mM) , en condiciones sólidas. Sin embargo, altas concentraciones de fósforo en el medio propició la precipitación del elemento y una baja producción en el número de hojas de tabaco.

Con respecto a la concentración de fósforo en el medio, Loneragan y Asher (1982) afirman que, al aumentar la concentración de fósforo puede limitar la disponibilidad de otros iones tales como  $Fe^{3+}$  y  $Ca^{2+}$ . Por ejemplo, el crecimiento del cultivo de células de *Ocimum* presentó una reducción debido a la precipitación de Fe- P del medio líquido MS (Dalton, 1983). La precipitación mineral fue atribuida a la falta de balance en la tasa de Fe en el EDTA que estaba contenido en el medio de cultivo con un nivel de 3:1. Por tanto altas concentraciones de EDTA fueron tóxicas para las células de *Ocimum*, por lo que se recomienda reducir los niveles de Fe en el medio de cultivo.

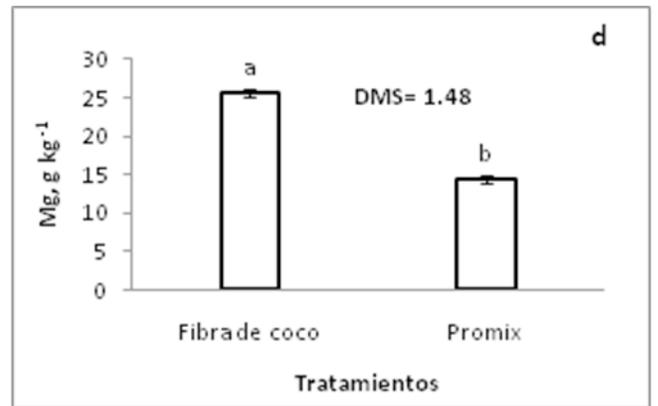
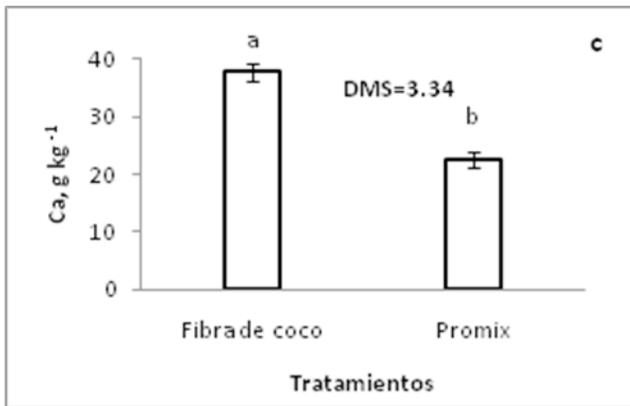
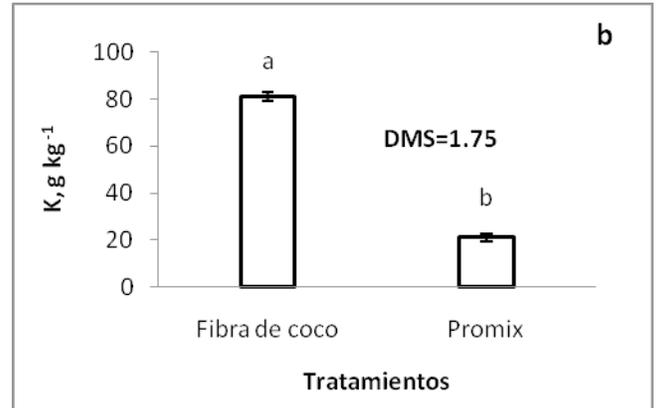
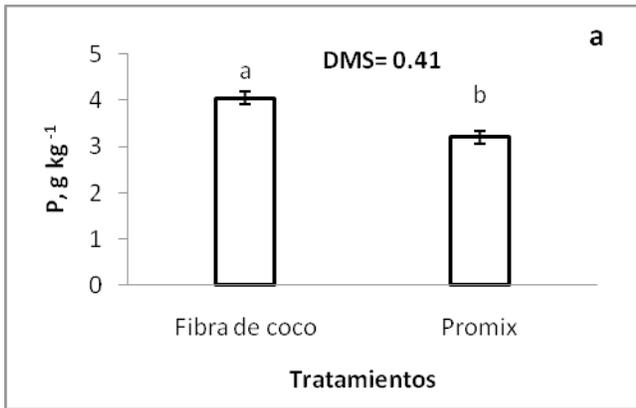
En el caso del calcio, este elemento se reconoce como mediador de diversos procesos fisiológicos en las células de las plantas. Al respecto, Saunders (1992) habla de la interacción entre el calcio y la transducción de señales de citocinina. Incrementos en la concentración interna de  $Ca^{2+}$  de tratamiento citocinina en células de *Funaria* condujo a la división celular. De acuerdo a Jansen *et al.* (1990) reportó un incremento en el número de embriones somáticos de *Daucus carota* en cultivos en suspensión debido a un incremento en la concentración de calcio. Sin embargo la ausencia de dicho elemento en los medios de cultivo, no es una limitante para que las plantas puedan seguir creciendo por determinado tiempo, lo cual se debe a fuentes endógenas de calcio, de acuerdo a Ramage (1999).

Con respecto a otros macronutrientes el potasio, magnesio y azufre, estos representan una importancia en la morfogénesis de los cultivos, por tanto un desbalance nutricional puede tener significativos efectos en la morfogénesis. De acuerdo a Ramage (1999) el potasio juega un papel predominante dentro del potencial osmótico en plantas, mencionando también su alta movilidad dentro de la planta a través de selectivos mecanismos de transporte de potasio.

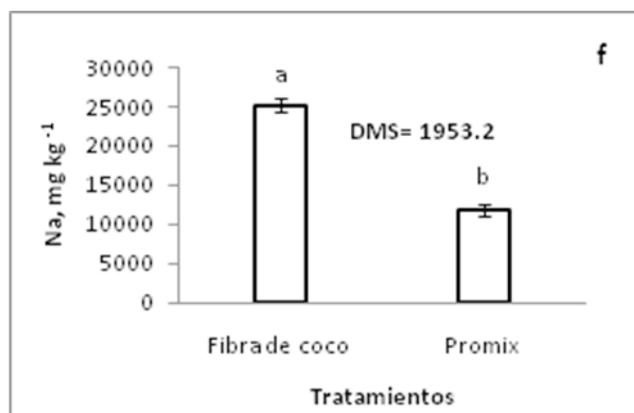
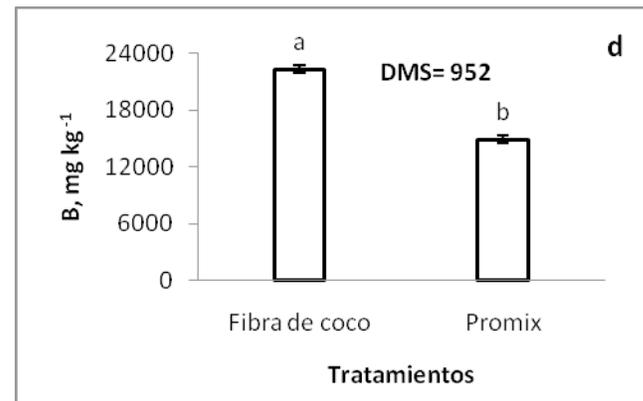
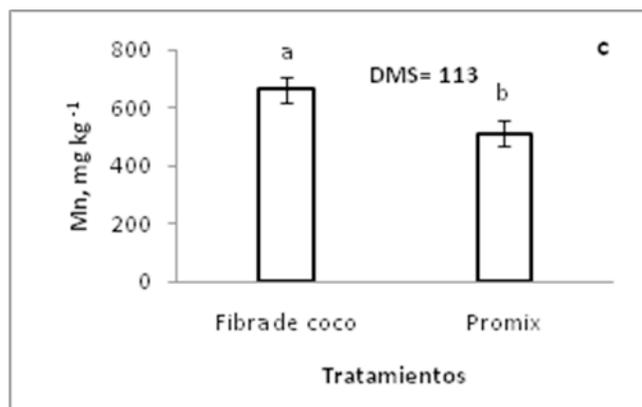
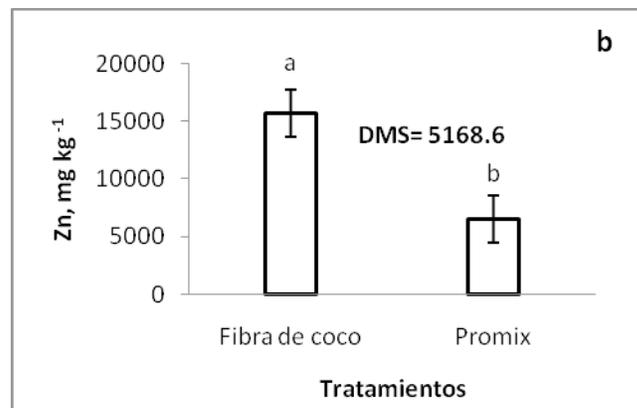
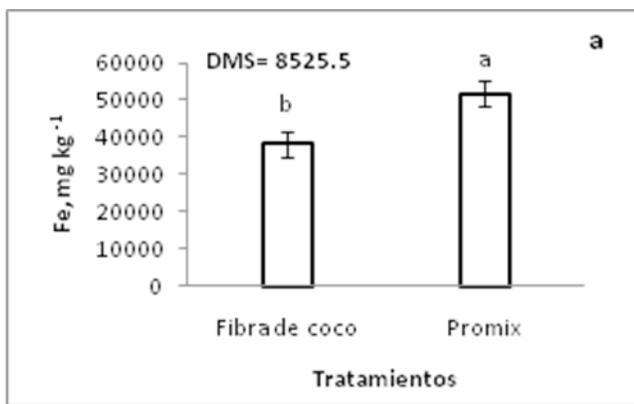
En la presente investigación, tanto en el día 40 como el 60, las concentraciones de los macroelementos así como de los microelementos en parte aérea de plántulas de *L. anceps* superan los valores reportados por Stancato (2008).

#### **7.4.2. Concentración nutrimental en raíces**

La concentración nutrimental en raíces de *L. anceps* a los 40 días de iniciado el experimento tuvo diferencias estadísticas entre el tratamiento T3 y T4 en la mayoría de los nutrimentos evaluados (**Figura 23**). El Cu, no reportó diferencias estadísticas entre tratamientos, tal como se puede observar en el **Cuadro 16**.



**Figura 23.** Concentración de macronutrientes: (a) fósforo, (b) potasio, (c) calcio y (d) magnesio en raíces de plántulas de *L. anceps* después 40 ddt con los medios de cultivos conteniendo fibra de coco y promix. Letras distintas sobre las barras en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).



**Figura 24.** Concentración de micronutrientos: (a) hierro, (b) zinc, (c) manganeso, (d) boro y (f) sodio en raíces de explantes de *L. anceps* después de 40 ddt con los medios de cultivo conteniendo fibra de coco y promix. Letras distintas sobre las barras en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

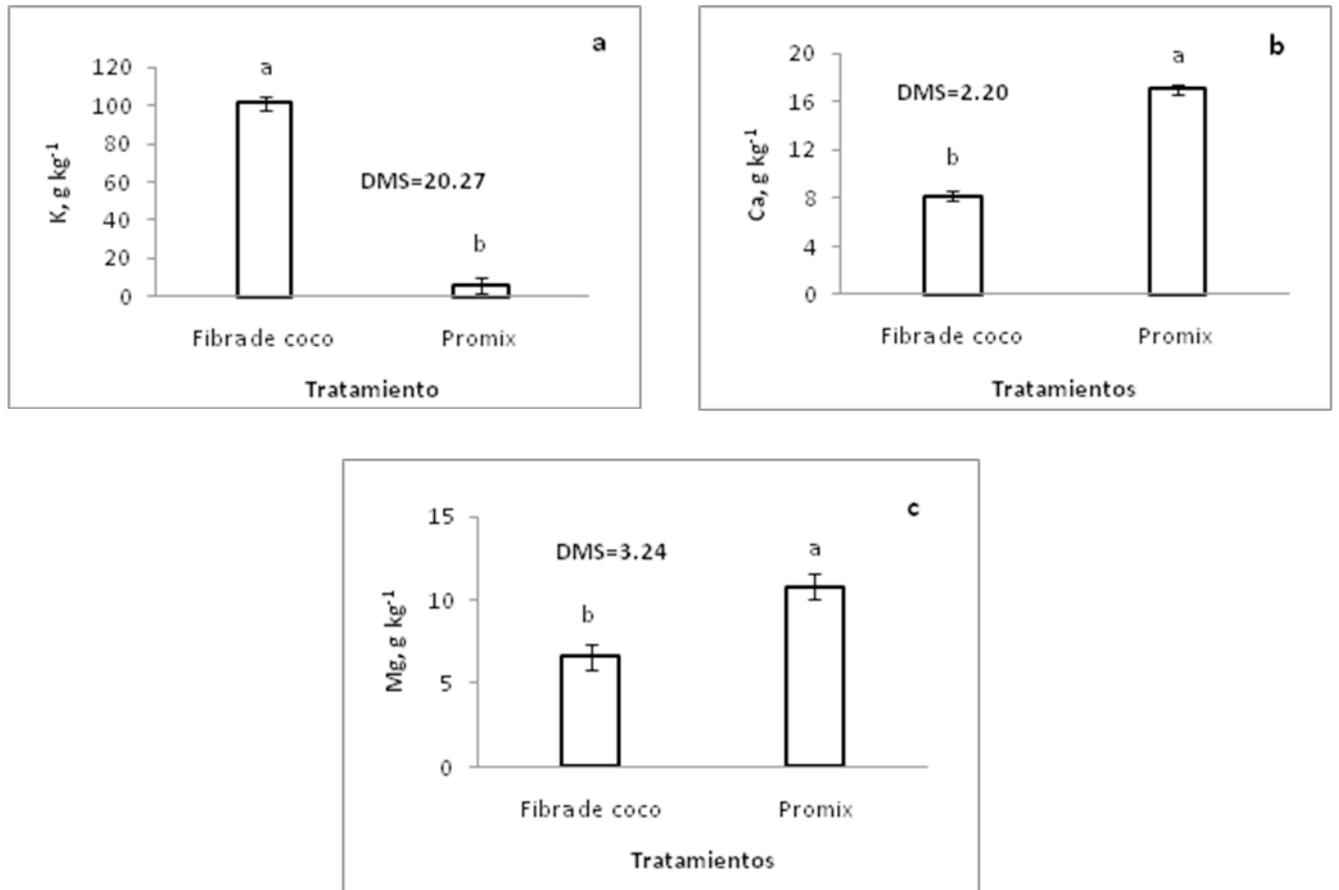
**Cuadro 16.** Concentración nutrimental en raíces de *L. anceps* 40 ddt

<b>Nutrimento</b>	<b>Fibra de coco (T3)</b>	<b>Promix (T4)</b>	<b>Diferencia mínima significativa (DMS)</b>
Cu, mg kg <sup>-1</sup>	407.70 ± 78.02	328.18 ± 5	125.29

La concentración nutrimental en raíz registrada al día 60 de iniciado el experimento en plántulas de *L. anceps* reportó diferencias estadísticas entre los tratamientos T3 y T4 para K, Ca, Mg, no así para P, Fe, Zn, Mn, B y Na, cuyos valores se pueden observar en el **Cuadro 17**.

**Cuadro 17.** Concentración nutrimental en raíces en *L. anceps* 60 ddt.

<b>Nutrientos</b>	<b>Fibra de coco(T3)</b>	<b>Promix (T4 )</b>	<b>Diferencia mínima significativa (DMS)</b>
P, g kg <sup>-1</sup>	0.6739 ± 0.21	1.3911 ± 0.21	0.9115
Fe, g kg <sup>-1</sup>	12698 ± 4840.79	18441 ± 635.69	14854
Zn, mg kg <sup>-1</sup>	21578 ± 19594.35	9279 ± 219.20	59618
Mn, mg kg <sup>-1</sup>	638.8 ± 348.14	267.3 ± 0.58	1059.2
B, mg kg <sup>-1</sup>	5020.7 ± 103.02	6506.1 ± 587.82	1815.7
Na, mg kg <sup>-1</sup>	10060 ± 1251.37	6662 ± 1150.11	5170.9



**Figura 25.** Concentración de (a) potasio, (b) calcio y (c) magnesio en raíces de plántulas de *L. anceps* después de 60 ddt con los medios de cultivos conteniendo fibra de coco y Promix. Letras distintas sobre las barras en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

En esencia, las raíces crecen donde pueden, por lo que también son factores importantes la impedancia mecánica, temperatura, aireación y disponibilidad de agua y sales minerales. La concentración de nutrimentos en raíz supone un parámetro de absorción de nutrientes del medio hacia la planta y de acuerdo a Ingestad y Ågren (1992), uno de los modelos para el estudio de la nutrición mineral *in vitro* y crecimiento de la planta se basa en la observación del crecimiento relativo de la planta y la relación lineal a la concentración externa de

los nutrimentos en el medio, lo cual se relaciona cercanamente a la absorción de elementos minerales del medio.

Con base a los resultados obtenidos por Ružic (2000) la plántula de cereza obtuvo mejores resultados de crecimiento y desarrollo bajo tratamiento en medio MS con doble concentración del medio MS, lo que presume mayor concentración de sales minerales. Sin embargo, Arditti (1992) afirma que, en el caso de las orquídeas epífitas son bajos los requerimientos de sales minerales para el desarrollo de esta especie. Acorde con esta idea, Stancato (2008) comprueba que en el caso de orquídeas epífitas brasileñas, el crecimiento y desarrollo de dichas especies se debió a bajas concentraciones de nutrimentos minerales contenidos en medios a basa de pulpa de plátano, manzana y tomate.

### 7.4.3. Acumulación nutrimental

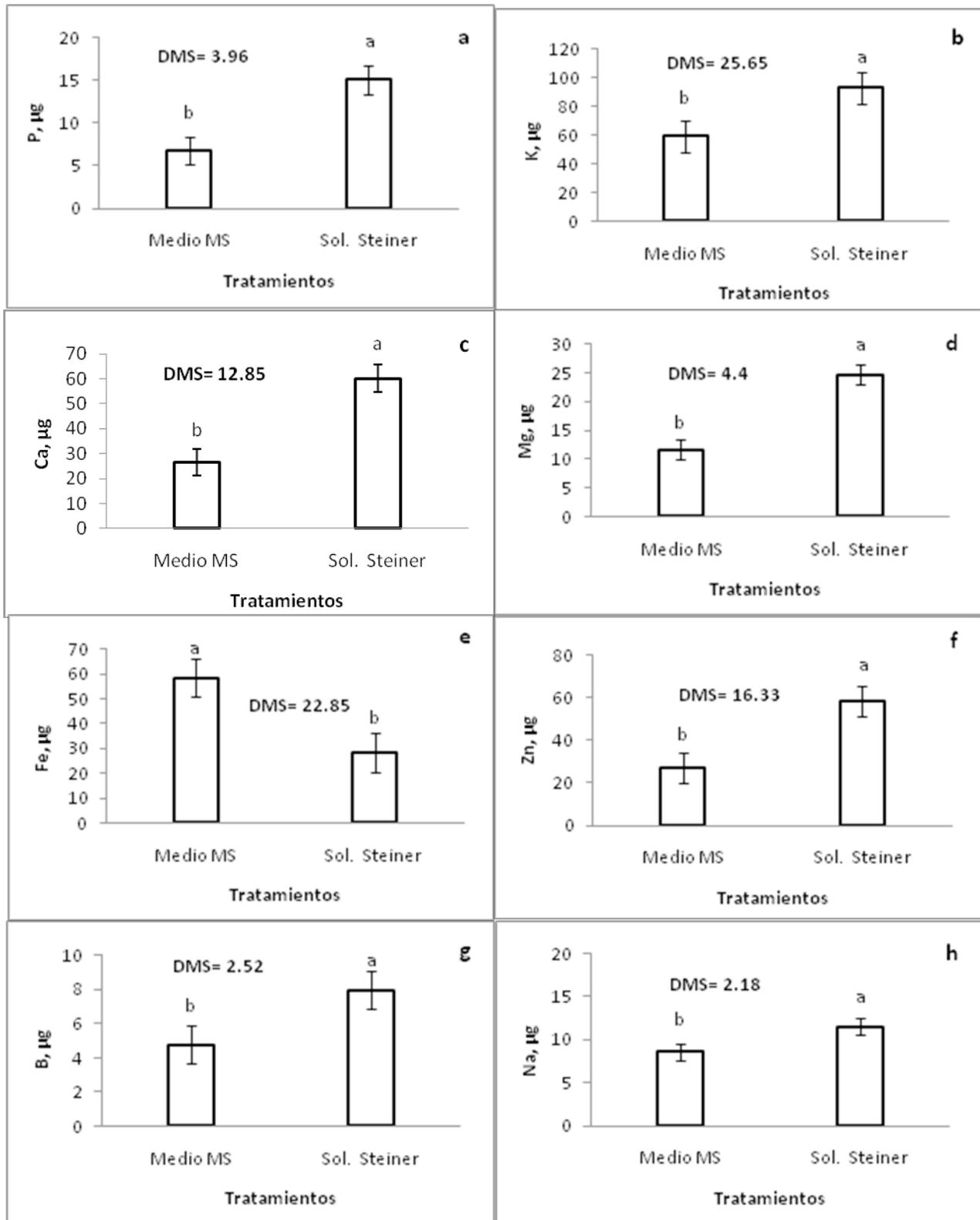
#### 7.4.3.1. Acumulación nutrimental en parte aérea

Los resultados obtenidos al día 20, revelaron diferencias estadísticas entre los tratamientos T1 y T2 en cuanto a los nutrimentos P, Ca, Mg, Fe, Zn, cuyos valores se pueden observar en la **Figura 26**.

De acuerdo a la prueba de Tukey, los nutrimentos que no presentaron diferencia estadística significativas entre tratamientos ( $p > 0.05$ ) se observan en el **Cuadro 18**.

**Cuadro 18.** Acumulación de nutrimentos en *L. anceps* 20 ddt

Nutrimentos μg	Medio MS (T1)	Solución Steiner (T2)	Diferencia mínima significativa (DMS)
<b>Cu</b>	0.17 ± 0.01	0.23 ± 0.04	0.07
<b>Mn</b>	1.12 ± 0.25	0.71 ± 0.09	0.43



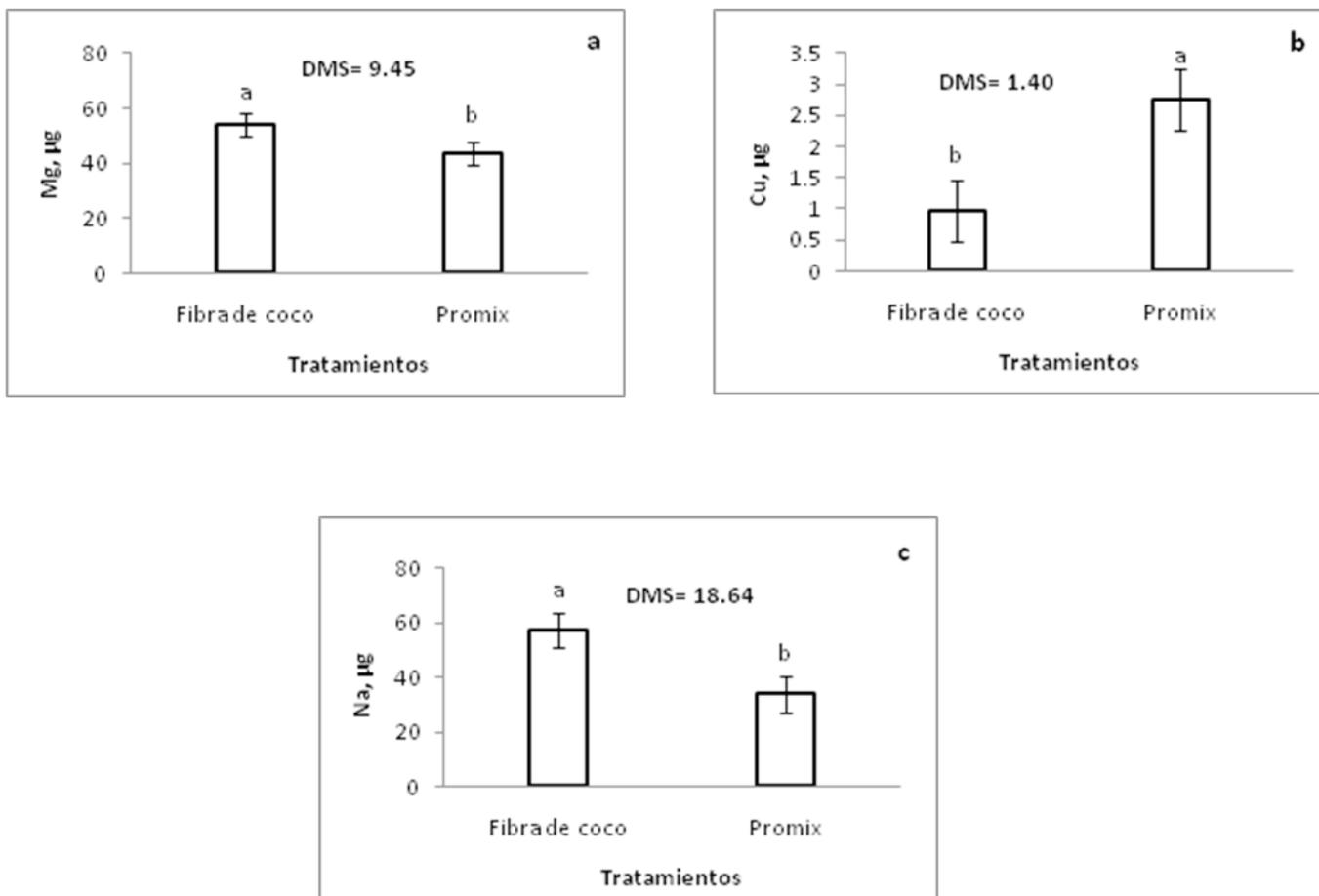
**Figura 26.** Acumulación de (a) fósforo, (b) potasio, (c) calcio, (d) magnesio, (e) hierro, (f) zinc, (g) boro y (h) sodio en explantes de *L. anceps* después 20 ddt con

los medios de cultivos MS y solución de Steiner. Letras distintas sobre las barras en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

La acumulación en parte aérea, en plántulas de *L. anceps* al día 40 de iniciado el experimento, reveló que en el caso de Ca, Mg y Na, existieron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos T3 y T4 tal como se observa en la **Figura 27**. Por otro lado, los nutrimentos P, K, Fe, Cu, Zn, Mn y B no presentaron diferencias estadísticas entre ambos tratamientos. Se presentan en el **Cuadro 19**.

**Cuadro 19.** Acumulación de nutrimentos en parte aérea en *L. anceps* 40 ddt

<b>Nutrimentos</b> <b>μg</b>	<b>Fibra de coco</b> <b>(T3)</b>	<b>Promix (T4)</b>	<b>Diferencia mínima</b> <b>significativa (DMS)</b>
<b>P</b>	9 ± 3.70	13.32 ± 1.81	6.61
<b>K</b>	210.78 ± 140.74	115 ± 4.30	225.72
<b>Ca</b>	81.61 ± 7.53	76.53 ± 10.22	20.35
<b>Fe</b>	43.63 ± 35.16	16.30 ± 1.37	56.42
<b>Zn</b>	25.04 ± 20.72	13.30 ± 3.51	33.70
<b>Mn</b>	1.41 ± 0.75	2.10 ± 0.24	1.27
<b>B</b>	36.60 ± 29.28	33.86 ± 0.13	46.94



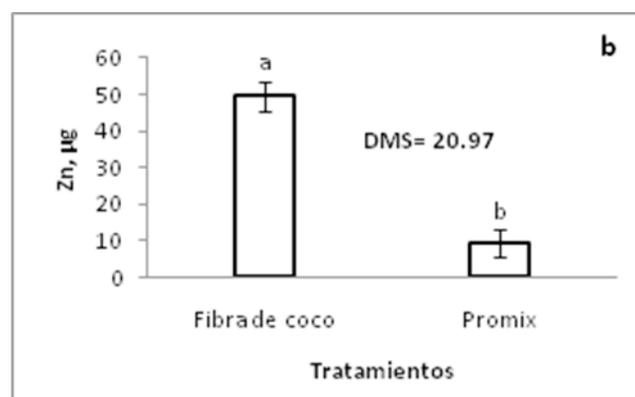
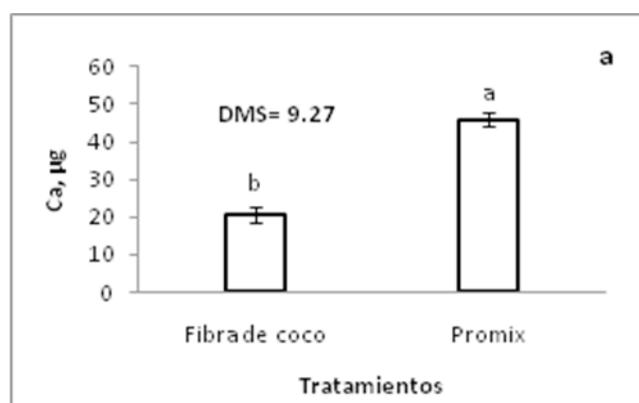
**Figura 27.** Acumulación de (a) cobre, (b) magnesio y (c) sodio en plántulas de *L. anceps* después de 40 ddt con los medios de cultivo conteniendo fibra de coco y promix. Letras distintas sobre las barras en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

Al día 60 de evaluación en la variable de acumulación en parte aérea, reveló que si bien existieron diferencias estadísticas entre los tratamientos T3 y T4, ésta diferencia no se aplicó en todos los nutrientes, tal como se muestra en el **Cuadro 20** donde se pueden observar aquellos nutrientes que, analizados por la prueba de Tukey, no demostraron tener diferencias estadísticas significativas. De acuerdo a dicha prueba los nutrientes Ca, Fe, Cu y Zn presentaron diferencias

en los promedios de la variable acumulación de nutrimentos en parte aérea, valores que se pueden observar en la **Figura 28**.

**Cuadro 20.** Acumulación de nutrimentos en parte aérea en *L. anceps* 60 ddt

Nutrimentos	Fibra de coco (T3)	Promix (T4)	Diferencia mínima significativa (DMS)
<b>P, µg</b>	5.52 ± 0.91	92 ± 0.31	2.94
<b>K, µg</b>	139.22 ± 50.36	65.63 ± 12.52	158
<b>Mg, µg</b>	14 ± 9.30	29.41 ± 2.45	29.17
<b>Fe, µg</b>	19.05 ± 0.64	19.28 ± 1.38	4.66
<b>Mn, µg</b>	0.85 ± 0.09	0.65 ± 0.09	0.41
<b>B, µg</b>	13.24 ± 1.95	16.68 ± 0.60	6.21
<b>Na, µg</b>	19.51 ± 0.33	22.04 ± 2.50	7.67



**Figura 28.** Acumulación de (a) calcio y (b) zinc en la parte aérea de plántulas de *L. anceps* después de 60 ddt con los medios de cultivo conteniendo fibra de coco y promix. Letras distintas sobre las barras en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

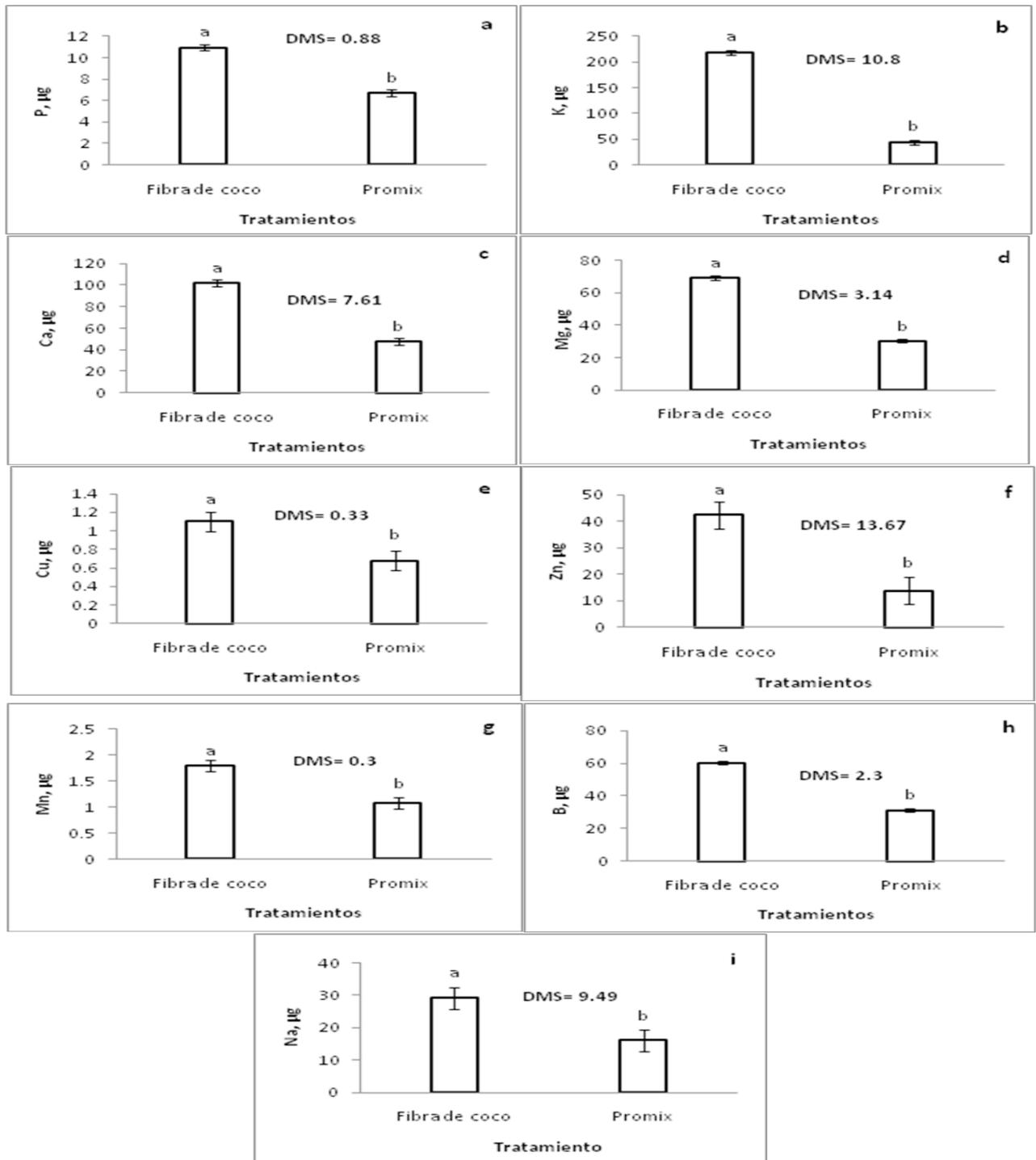
#### 7.4.3.2. Acumulación nutrimental en raíces

A los 40 ddt no se presentaron diferencias estadísticas significativas en la acumulación de Fe en raíces entre T3 y T4 (**Cuadro 21**).

**Cuadro 21.** Acumulación de nutrimentos en raíz de *L. anceps* 40 ddt

<b>Nutrimentos</b>	<b>Fibra de coco (T3)</b>	<b>Promix (T4)</b>	<b>Diferencia mínima significativa (DMS)</b>
<b>Fe, µg</b>	103.12 ± 13.79	108.63 ± 3.11	22.66

En el caso de la variable de acumulación de nutrimentos en raíces de *L. anceps* 40 ddt, existieron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos T3 y T4 (**Figura 29**).

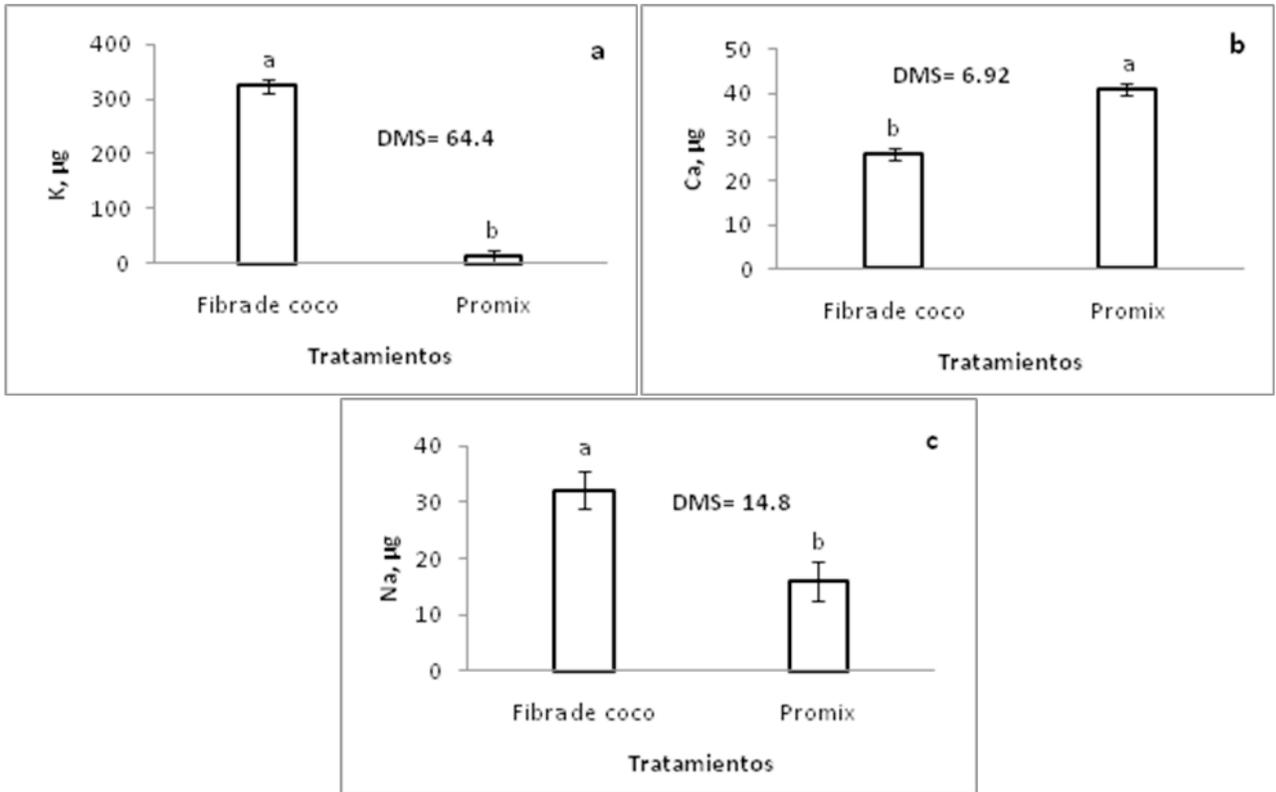


**Figura 29.** Acumulación de fósforo (a), potasio (b), calcio (c), magnesio (d), cobre (e), zinc (f), manganeso (g), boro (h) y sodio (i) en raíces de *L. anceps* después de 40 ddt con los medios de cultivo conteniendo fibra de coco y promix. Letras distintas sobre las barras en cada gráfica, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

Finalmente, en la variable de acumulación de nutrimentos en raíces de *L. anceps*, los resultados obtenidos al día 60 después de iniciado el experimento revela que, existieron diferencias estadísticas entre el tratamiento T3 y T4, para K, Ca, Cu y Na, (**Figura 30**). En el caso de los nutrimentos P, Mg, Fe, Zn, Mn y B, no presentaron diferencia estadística significativa entre tratamientos (**Cuadro 22**).

**Cuadro 22.** Acumulación de nutrimentos en raíces de *L. anceps* 60 ddt

<b>Nutrimentos</b>	<b>Fibra de coco (T3)</b>	<b>Promix (T4)</b>	<b>Diferencia mínima significativa (DMS)</b>
<b>P, µg</b>	2.15 ± 0.67	3.33 ± 0.51	2.57
<b>Mg, µg</b>	21.22 ± 2.32	25.96 ± 1.87	9.09
<b>Fe, µg</b>	40.63 ± 15.49	44.26 ± 1.52	47.35
<b>Zn, µg</b>	69.05 ± 62.70	22.27 ± 0.52	190.77
<b>Mn, µg</b>	2.04 ± 1.11	0.64 ± 0.001	3.38
<b>B, µg</b>	16.06 ± 0.32	15.61 ± 1.41	4.40



**Figura 30.** Acumulación de potasio (a), calcio (b) y sodio (c), en las raíces de explantes de *L. anceps* 60 ddt con los medios de cultivo conteniendo fibra de coco y promix. Letras distintas sobre las barras en cada subfigura, indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

La variable de acumulación de nutrimentos en parte aérea a 20 ddt los resultados indicaron diferencia estadística significativa entre los tratamientos T1 y T2 para P, K, Ca, Mg, Fe, Zn, B y Na, no así en Cu y Mn, en el caso de Cu el valor más alto fue el reportado por T2 (0.23 µg) y en Mn el valor más alto fue el reportado por T1 (1.12 µg).

En la misma variable pero a 40 ddt, los resultados indicaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos T3 y T4 para Mg, Cu y Na. El tratamiento T3 reportó los valores más altos de acumulación para Mg y Na (53 y 57 µg, respectivamente). Para Cu el valor más alto de acumulación fue de 2.75 µg bajo tratamiento T4. La variable de acumulación de nutrimentos en raíces a 40 ddt reportó diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos T3 y T4 con

respecto a P, K, Ca, Mg, Cu, Zn, Mn, B y Na, siendo en todos estos, el tratamiento T3 el que reportó los mayores valores de acumulación con respecto a T4.

Con respecto a los resultados del 60 ddt, existieron diferencias estadísticas significativas para Ca y Zn entre los tratamientos T3 y T4. En el caso de Ca, el tratamiento T4 reportó una acumulación de 46  $\mu\text{g}$ , para Zn, la mayor acumulación se presentó en T3 (50  $\mu\text{g}$ ). En el caso de la acumulación de nutrimentos en raíces a 60 ddt reportó diferencias estadísticas significativas para K, Ca y Na. En K y Na, los valores más altos de acumulación se presentaron en el tratamiento T3 (324 y 32  $\mu\text{g}$ , respectivamente), en cuanto al Ca, el tratamiento T4 reportó el mayor valor de acumulación con 40  $\mu\text{g}$ , con respecto al valor de acumulación reportado por T3 (26  $\mu\text{g}$ ).

## VIII. RECOMENDACIONES

Las recomendaciones al finalizar el experimento son, en el caso de los tratamientos T1 y T2 (medio MS y solución de Steiner) cuya atmosfera presentó una elevada humedad, utilizar otros medios de soporte que no sea la malla metálica que se usó en este trabajo y sustituirlo por material que absorba al medio MS y solución de Steiner como Florialite (mezcla de vermiculita y pulpa de papel) (Afreem- Zobayed *et al.*, 2000), vermiculita y tapones de celulosa (Kirdmanee *et al.*, 1995) y rockwool (Kozai *et al.*, 1991).

Otro factor a considerar es el uso de fungicidas en el medio *in vitro*, en la propagación de *L. aniceps* el uso de Captán en la dosis señalada reportó porcentajes menores a 35% en 60 ddt, si se desea trabajar con dicho fungicida en otras especies vegetales, se tiene que evaluar la dosis correcta para cada especie.

## **IX. CONCLUSIONES**

En conclusión en la variable de contaminación de cultivo, las plántulas establecidas en los tratamientos T1 y T2 (medio Ms y solución de Steiner) presentaron problemas de necrosis ocasionado por el alto nivel de humedad del ambiente. En el caso de los tratamientos T3 y T4 (fibra de coco y Promix) el problema en dicha variable correspondió a la contaminación fúngica alcanzando valores menores de 35% en el tratamiento T3 y menor a 25% para el tratamiento T4 en el periodo de 60 días que duró la evaluación.

Con respecto a la variable de crecimiento, los parámetros de altura del explante y longitud de raíces no mostraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de fibra de coco (T3) y Promix (T4) durante el periodo de evaluación, reportando un promedio mayor a 3 cm en altura del explante y 2 cm en longitud de raíces.

En la misma variable de crecimiento, los parámetros biomasa seca tanto de parte aérea como en raíces en 60 días de evaluación, no reportaron diferencias estadísticas entre los tratamientos T3 y T4, reportando un promedio mayor a 5 mg en parte aérea y mayor a 3 mg en raíces.

En la variable de calidad los parámetros de concentración de nutrimentos tanto en parte aérea como en raíces, mostraron diferencias estadísticas entre los tratamientos T3 y T4. La mayor concentración de macronutrimentos en parte aérea fue reportado en el tratamiento T4 (Promix); en el caso de los micronutrimentos la mayor concentración se reportó en el tratamiento T3 (fibra de coco). Los resultados obtenidos en el parámetro de concentración de nutrimentos en raíces indicó que la mayor concentración de macronutrimentos se obtuvo en el tratamiento T4 (Promix) y en el caso de los micronutrimentos no se presentó diferencias estadísticas entre ambos tratamientos.

El parámetro de acumulación de nutrimentos tanto en parte aérea como en raíces no reportó diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos T3 y T4 a 60 ddt.

Con respecto al impacto que tuvo el uso de los medios alternativos en la calidad de los explantes de *L. anceps*, se concluye que, tanto en el tratamiento T3, como T4 no reportaron diferencias estadísticas significativas en cuanto la concentración y acumulación de nutrimentos, fomentando el desarrollo de las plántulas de *L. anceps* en el periodo de investigación.

A partir de los resultados obtenidos en las variables de crecimiento y calidad, se puede concluir que, el uso de medios alternativos al MS tuvo un efecto positivo en plántulas de *L. anceps* en un periodo de 60 días de evaluación.

## X. LITERATURA

Afreen-Zobayed F., Zobayed M. A., Kubota C., Kozai T. 1999. Supporting Material affects the growth and development of *in vitro* sweet potato plantlets cultured photoautotrophically. *In vitro Cellular and Developmental Biology. Plant* 35(6): 470-474.

Afreen-Zobayed F., Zobayed S. M. A, Kubota C., Kozai T. and Hasegawa O. A. 2000. Combination of vermiculite and paper pulp supporting material for the photoautotrophic micropropagation of sweet potato. *Plant Science* 157: 225–231.

Alcántar, G. C. y Sandoval V., M.1999. Manual de análisis químico de tejido vegetal. Guía de muestreo, preparación, análisis e interpretación. Publicación Especial No. 10 de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo A.C., Chapingo, Méx.

Arditti, J. 1982. Orchid seed germination and seedling culture: A manual. In: Arditti, J. (Ed.), *Orchid biology: Reviews and perspectives*. Ithaca: Comstock publishing associates 2:244-370.

Arditti, J. 1996. Orchid micropropagation: The path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators. *Botanical Journal of the Linnean Society* 122: 183-241.

Ávila D. I. y Salgado G. R. 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Biológicas*. Publicado por la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 8: 138-149.

Beruto, M., Beruto, D. and Debergh P. 1999. Influence of agar on *in vitro* cultures: I physicochemical properties of agar gelled media. *In vitro Cellular and developmental. biology. plant* 3 (5):86-93.

Bures Profesional, S. A. 2009. Fibra de coco. Consultado en: <http://www.grn.es/sicosa/tecnic/fibradecoco.htm>, 30 de junio de 2009

- Buxton, R., Johnson, P and Espie P.1996. *Sphagnum* research programme: the ecological effects of commercial harvesting. Published by Department of Conservation, Wellington, New Zealand. Science for Conservation: 25: 33.
- Coic, Y. 1973. Les problemes de composition et de concentration des solutions nutritive en culture sans sol. Proc 3 ed. International congress on soilless culture. Sassari, Italy. pp: 158- 164.
- Dalton, C.C., Iqbal, K. and Turner, D.A. 1983. Fe and P precipitation in Murashige and Skoog media. *Physiol Plant.* 57: 472-476.
- Dantas, A.K., Majada, J.P., Fernández, B., Cañal, M.J. 2001. Mineral nutrition in carnation tissue cultures under different ventilation conditions. *Plant Growth.* 33: 237- 243.
- De la Rosa, P.1988. Cultivo *in vitro* de yemas axilares del canelero (*Cynnamomum zeylanicum*, Nees). Tesis de Licenciatura. Chapingo, México.
- De Melo, F. W., Barbante, K.G. and Pimentel ,C.A. 2006. Micropropagation and genetic stability of a *Dendrobium hybrid* (orchidaceae). *In vitro Cellular and Developmental. Biology Plant* 42: 568–571.
- Debergh, P. C. and Zimmerman, R. H. 1991 ed. Micropropagation technology and application. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp:71-93.
- Do Valle Rego-Oliveira L. and de Faria R. T.2005 *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. *Acta Scientiarum. Agronomy.* Maringá 27(1): 1-5.
- Dole, J. M. 2004. Floriculture. Principles and Species. Pearson Prentice Hall. New York. pp: 697-706.
- Espejo, S. A., García, C. J., López, F. R. y Sánchez S. L. 2002. Orquídeas del Estado de Morelos. Herbario AMO-UAM Iztapalapa. México. pp: 4-13.

- Gil I. V., Bastida A. T., Flores G. E., y Navarro E. L. 2007. Reproducción y manejo de orquídeas mexicanas. Universidad Autónoma Chapingo. México. pp: 31-42.
- González, J. 2008. Cultivo de tejidos: una herramienta para el fitomejoramiento. Contacto Nuclear. ININ.49: 37-40.
- Hahn E. J. and Paek, K. Y. 2001. High photosynthetic flux and high CO<sub>2</sub> concentration under increased number of air exchanges promote growth and photosynthesis of four kinds of orchid plantlets *in vitro*. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. September–October. Society for *In vitro Biology* pp: 37:678–682.
- Halbinger, F. 1993. *Laelias* de México. Asociación Mexicana de Orquideología, A.C. (Ed.) .México, D.F. pp: 71.
- Ingestad, T. and Ågren, G. 1992. Theories and methods on plants nutrition and growth. *Physiol. Plant*. 84: 177 – 184.
- Jansen, M.A.K., Booij, H., Schel, J.H.N., de Vries, S.C.1990. Calcium increases the yield of somatic embryos in carrot embryogenic suspensión cultures. *Plant cell reports*. 9: 221- 223.
- Kirdmanee, C., Kitaya, Y., Kozai, T. 1995. Effects of CO<sub>2</sub> enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of Eucalyptus plantlets *in vitro* and *ex vitro*. *In vitro cellular and developmental biology plant*. 31: 144- 149
- Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for orchid seed germination. *American Orchid Society Bulletin*. 15: 214- 217
- Kozai, T. and Kubota C.2005. Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production. *System Springer* . pp: 53 – 60.

- Krikorian, A. D. 1991a. Propagación clonal *in vitro*. Roca, W. Mroginski, L. A Edit. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT. pp:96–125.
- Krikorian, A.D. 1995b. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: Davies, P.J. ed. Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp: 774 – 798.
- Kuan J. Ch. y González V. L. 1993. Introducción al cultivo y manejo de las orquídeas. Instituto Nacional de Aprendizaje. Costa Rica. pp: 122.
- Larson, R. A. 2004. Orquídeas. Introducción a la Floricultura. México. pp: 119-123.
- Lee, E. H., Laguna C. A., Murguía G. J., Elorza M. P., Iglesias, A.L., García, R. B., Barredo, P.F y Santana, B.N. 2007. Regeneración *in vitro* de *Laelia anceps* ssp. *Dawsonii*. Revista UDO Agrícola 7 (1): 58-67.
- Lee, E.C.M and Defossard, R.A. 1977. Some factors affecting multiple bud formation of strawberry (*Fragaria ananassa* Duchesne) *in vitro*. Acta Horticulture. 78: 187- 195.
- Loneragan, J.F. and Asher, C.J. 1982. Response of plants to phosphate concentration in solution culture: II rate of phosphate absorption and relation to growth. Soil Science. 103:311- 318.
- MacDonald, B. 2006. Practical woody plant propagation for nursery growers. Timber Press, Inc. Portland, Oregon. U.S.A. 595 p.
- McKendrick, S. 2000. Manual para la germinación *in vitro* de orquídeas. Ceiba Foundation for Tropical Conservation.
- Medina, E.A. 1985. Las orquídeas cultivadas. Universidad Nacional de Tucumán. Argentina. pp. 6- 14.
- Moncaleán, P., Cañal, M.J., Fernández, H., Fernández, B. y Rodríguez A. 2003. Nutritional and gibberellic acid requirements in kiwifruit vitroponic cultures. *In vitro* Cell. Dev. Biol.—Plant. 39:49–55.

- Morel, G.M.1960.Producing virusv- free *Cymbidium*. Am.Orchid Soc. Bull. 29: 495-497.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol.Plantarum*. 15: 473 – 493.
- Murguía González, J, y Lee Espinosa, H.2004. Manual de producción de orquídeas.Fundación Produce Veracruz, A.C. Consultado en: <http://www.funprover.org/agroentorno/enero/pdfs/orquideas.pdf> 30 de junio de 2009.
- Neville, E. 2001. La luz. Rangos ideales para algunas plantas. Consultado en: <http://www.grancanariaweb.com/edgar/orquidea/luz.htm>
- Norma Oficial Mexicana NOM- 021- SEMARNAT- 2000
- Oliet, P. J., Robredo, G. E., Salazar, N.J. y Villar, M.R. 2008. Fertilización otoñal de encino en vivero: Efectos sobre la morfología, nutrientes, potencial de enraizamiento y respuesta postrasplante. *Actas de la IV Reunión sobre Repoblaciones Forestales. Cuad. Soc. Esp. Cienc. For.* 28: 171-176.
- Orlikowska, T. 1987. Vitrification problem in the *in vitro* culture of fruit tree rootstocks. *Acta Hort.* 212: 239- 244.
- Pasqualetto, P.L., Zimmerman, R.H., Fordham, I. 1988. The influence of K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 14: 31- 40.
- Pedroza, M. J. and Mican, G. Y. 2006. Asymbiotic germination of *Odontoglossum gloriosum* rchb.f. (orchidaceae) under *in vitro* conditions. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. November–December. Society for *In vitro* Biology. 42: 543–547.
- Prasad, V.S.S. and Duta, G. S. *In vitro* shoot regeneration of gladiolus in semi-solid agar versus liquid cultures with support systems. 2006. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* .87:263–271.
- Preece, J. E. and Sutter, E. G. 1991. Acclimatization of micropropagated plant to the greenhouse and field. *Micropropagation technology and application*. Ed. P.C. Debergh and R.H. Zimmerman. pp: 71-93.

Premier PROMIX. 2008. Ficha técnica PRO- MIX "PGX". Consultado en:

<http://www.premierhort.com/website/profweb/eprofweb/eprofgrower/egrowte>

[chdata/etechdatapgx.html](http://www.premierhort.com/website/profweb/eprofweb/eprofgrower/egrowte) 30 Junio 2009.

Quorin, M., Lepoivre, P.E. 1977. Étude de milieu adapté aux cultures *in vitro* de *Prunus*. Acta Hort. 78: 437- 442.

Ramage, C.M. 1999. The role of mineral nutrients in the regulation of plant development *in vitro*. pH dissertation. The University of Queensland

Ramage, M.C. and Williams R.R.2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In vitro* Cellular and. Developmental Biology Plant 38:116–124.

Ramos, M. S. S. 1969. O uso do tomate nos meios de cultura. *In: A orquídea e a sua reprodução pela semente*. São Paulo: saraiva. pp. 47-52.

Roca, W. M. 1993. Biotechnology research unit. Annual Report. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia.

Rodríguez J. L. Rosas, M.V., Cervantes, M.T. y Cruz, S.E.1996. Obtención y propagación de plantas de alcatraz *Zantedeschia* sp. a partir del cultivo *in vitro* de yemas de bulbo. Memorias del III Congreso Nacional de Biotecnología. ANABAF. Chihuahua. México.

Rodríguez, L., González, R., Díaz A., Fajardo, E., Sánchez, E., Hernández, J., Castañeira, M.A., De la Cruz G y González, J. 2005. Producción y recuperación de orquídeas silvestres cubanas. En línea. Cuba. Consultar en: [www.dama.gov.co](http://www.dama.gov.co)

Rosales, E. M., Rodríguez, E. F., y Alvarado, G. O. 2003. Diseño y construcción de un sistema de inmersión temporal. Centro Agrícola, Año 30, No. 1, enero-marzo. pp: 69-72.

Ružić, Dj.V., Cerović, R.M. and Čulafić, Lj.2000. Relationship between the concentration of macroelements, their uptake and multiplication of cherry rootstock Gisela 5 *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 63: 9–14.

- Salisbury, F. B., Ross, C. W. 1994. Fisiología vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica. México. pp: 71-94.
- Santos, L. H., Aguirre E. L., Campos, C.J. y Martínez G. M. 2006. Ciencia y Desarrollo en Internet. CONACYT. México. pp: 2.
- Sarmiento, F. M. 2000. Orquídeas Mexicanas. BANBRAS. México. pp. 1.
- Saunders, M.J.1991. Cytokinin signal transduction through  $Ca^{2+}$  in mosses. Progress in plant growth regulation. Proceeding of the 14<sup>th</sup> International Conference on Plant Growth Substances. pp: 65 – 72
- Sheehan, T. 1994. An Illustrated survey of orchid genera. Timber Press. Portland, Oregon. 421 p.
- Sheelavantmath S. S., Murthy, H. N., Pyati, A.N., Ashok Kumar H.G. and Ravishankar, B. V. 2000. *In vitro* propagation of the endangered orchid, *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. through rhizome section culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. .60: 151–154.
- Sociedad Colombiana de Orquideología (SCO). 1965. Manual del cultivo de orquídeas. Impresiones Gráficas Ltda. 4ta edición. pp: 151.
- Solís, P. E. 2002. Evaluación de medios para cultivo *in vitro* de dos especies de orquídeas: *Brassavola cucullata* L. y *Oncidium cebollata* (Jacq) Sw. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo.
- Soto, M. A. 1993. Clasificación infraespecífica de *Laelia anceps*. Orquídea. México. 13(1-2): 125-144.
- Stancato G., Ferreira A. M. e Cangiani F. A. 2008. Crescimento de orquídeas *in vitro*: Adição de polpa de frutos. Centro de Solos e Recursos Agroambientais, Instituto Agronômico, Campinas (SP). Bragantia, Campinas. 67(1): 51-57.
- Steiner, A. A. 1961. A universal method for preparing nutrient solutions of certain, desired composition. Plant and Soil. 15:134-154.

- Steiner, A. A. 1968. Soilles culture. Proceedings of the 6<sup>th</sup> colloquium of the International Potash Institute. Florence, Italy. Published by Int. Potash Institute Berne, Switzerland. pp: 324- 341.
- Steiner, A. A. 1973. The selective capacity of tomato plants for ions in a nutrient solution. Proceedings 3<sup>rd</sup> International Congress on Soilles Culture Wageningen, The Netherlands. pp: 43-53.
- Tapia, M. C. 2008. Crecimiento y productividad del musgo *Sphagnum magellanicum* Brid. En turberas secundarias de la provincia de Llanquihue, Chile. Universidad Austral de Chile. Tesis de Licenciatura. Chile. pp: 3-7.
- Vacin, E.F and Went, F.W. 1949. Some pH changes in nutrients solutions. Botanical Gazette. 110: 605 – 617.
- Valenzuela, L.M. 1998. Uso de antibióticos en medios de cultivo para reducir la presencia de agentes contaminantes en la propagación *in vitro* de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo.
- Vidal, M. B. 2007. Germinación *in vitro* y nutrición de Heliconias. Tesis en Maestría en ciencias. Colegio de Postgraduados. Edafología. Montecillo, México.
- Vidalie, H. 1976. Cultivo *in vitro*. Ed. Científica S. A de C. V. México.
- Vieitez, A.M., Ballester, A., San- José, M.C., Vieitez, E. 1985. Anatomical and chemical studies of vitrified shoots of chestnut regenerated *in vitro*. Physiol. Plant. 65: 177- 184.
- White, J. 1996. Taylor's Guide to Orchids. Frances Tenenbaum, Series Editor. New York: Houghton-Mifflin. Consultado en:  
<http://es.wikipedia.org/wiki/Laelia>
- William, S. D., Gangaprasad, A., Seeni S. and Sarojini M. V. 2003. Micropropagation and eco restoration of *Vanda spathulata*, an exquisite orchid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 72: 199-202.

- Williams, R.R. 1992. Mineral nutrition *in vitro* a mechanistic approach. Aust J.Bot. 41: 237- 251.
- Winkelmann, T., Geier, T. and Preil, W. 2006. Commercial *in vitro* plant production in Germany 1985-2004. Plant Cellular Tissue and Organ Culture. 86: 319-327.
- Yoneo, S. 1991. Clonal propagation of Orchids. Plant Tissue Culture Manual C1. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp: 1-7.
- Zettler, L., Stewardt, S., Bowles, M. and Jacobs, K.2001. Mycorrhizal fungi and coldassisted symbiotic germination of the federally threatened eastern prairie fringed orchid, *Platanthera leucophaea* (Nuttall) Lindley. Am. Midland Nat. 145: 168-175.