



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

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

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**FISIOLOGÍA VEGETAL**

**MORFOGÉNESIS *in vitro* DE *Bletia  
purpurea* var. *purpurea* (Lam.) DC.**

**ELIUD SERRANO FLORES**

**T E S I S**  
**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO**

**2016**

La presente tesis titulada: "**MORFOGÉNESIS *in vitro* DE *Bletia purpurea* var. *purpurea* (Lam.) DC**", realizada por el alumno: **Eliud Serrano Flores**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS**  
**POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

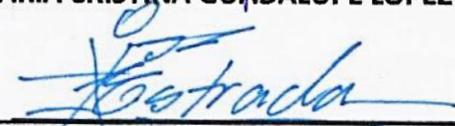
**FISIOLOGÍA VEGETAL**

**CONSEJO PARTICULAR**

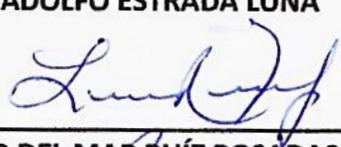
**CONSEJERA**

  
\_\_\_\_\_  
**DRA. MARÍA CRISTINA GUADALUPE LÓPEZ PERALTA**

**ASESOR**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. ANDRÉS ADOLFO ESTRADA LUNA**

**ASESORA**

  
\_\_\_\_\_  
**DRA. LUCERO DEL MAR RUÍZ POSADAS**

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Diciembre de 2016

# MORFOGÉNESIS *in vitro* DE *Bletia purpurea* var. *purpurea* (LAM.) DC.

Eliud Serrano Flores, MC

Colegio de Postgraduados, 2016

## RESUMEN

*Bletia purpurea* var. *purpurea* es una orquídea terrestre con potencial ornamental. La tasa baja de germinación *in situ*, el lento crecimiento, así como actividades antropocéntricas que modifican sus hábitats son factores que ponen en riesgo las poblaciones nativas de esta especie y a la mayoría de los miembros de la familia Orchidaceae. El objetivo de esta investigación fue establecer un protocolo de regeneración *in vitro* vía organogénesis directa. El establecimiento exitoso del cultivo aséptico se logró al tratar a las semillas con una solución de Tween® 20 (1%; 10 min), Benlate® + Captan® (8 g L<sup>-1</sup> c/u; 30 min), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%; 60 min), NaOCl +plata coloidal (15% + 10%; 15 min). La germinación fue de 100% a los 33 días en medio MS sin vitaminas, adicionado con sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>). Los discos de pseudobulbo disecados de las plántulas germinadas *in vitro* fueron los mejores explantes para la inducción de brotes, ya que produjeron después de cuatro semanas de cultivo 1.4 brotes por explante cuando fueron cultivados en medio MS (50% de sales), sacarosa (20 g L<sup>-1</sup>), carbón activado (1g L<sup>-1</sup>), y la combinación de citocininas [KIN (1.9 mg L<sup>-1</sup>), BA (1–3 mg L<sup>-1</sup>)], con auxinas [ANA (0.5–1 mg L<sup>-1</sup>) y AIA (0.54–0.93 mg L<sup>-1</sup>)]. En la fase de multiplicación se logró incrementar la tasa de proliferación de propágulos a 2.3 brotes por explante, cuando estos fueron subcultivados por tres semanas en medio MS adicionado con sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>), carbón activado (1 g L<sup>-1</sup>), BA (1–3 mg L<sup>-1</sup>) y ANA (0.5–1 mg L<sup>-1</sup>). La producción de raíces adventicias para el enraizamiento de brotes fue del 100% a las cuatro semanas en el medio MS a la mitad de sales adicionado con sacarosa (20 g L<sup>-1</sup>) y AIB (2 y 2.5 mg L<sup>-1</sup>). El porcentaje de supervivencia fue de 100%. El protocolo de regeneración obtenido aporta conocimiento básico sobre la propagación *in vitro* de una orquídea mexicana y es una opción para el rescate y conservación de la especie.

**Palabras clave:** orquídea, amenazada, germinación asimbiótica, micropropagación, organogénesis.

# ***In vitro* MORPHOGENESIS OF *Bletia purpurea* var. *purpurea* (LAM.) DC.**

**Eliud Serrano Flores, MC**

**Colegio de Postgraduados, 2016**

## **ABSTRACT**

*Bletia purpurea* var. *purpurea* is a terrestrial orchid with ornamental potential. The low rate of *in situ* germination, slow growth rates, and anthropocentric activities, which disturb natural habitats, are factors threatening the native populations of this species as well as most members of the Orchidaceae. The objective of this research was to establish an *in vitro* protocol for plant regeneration via direct organogenesis for this orchid. The establishment of the aseptic cultures was successful when the seeds were processed with a particular treatment including a series of immersions in different solutions including Tween® 20 (1%; 10 min), Benlate® + Captan® (8 g L<sup>-1</sup> each; 30 min), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%; 60 min) NaOCl + colloidal silver (15% + 10%; 15 min). Germination was 100% after 33 days of seed inoculation on MS medium without vitamins added with sucrose (30 g L<sup>-1</sup>). The pseudobulb discs dissected from germinated seedlings were the best explants for shoot induction since they produced 1.4 shoots per explant after been cultured on MS medium (50% salts), sucrose (20 g L<sup>-1</sup>), activated charcoal (1g L<sup>-1</sup>), and the combination of cytokinins [KIN (1.9 mg L<sup>-1</sup>) or BA (1-3 mg L<sup>-1</sup>)] and auxins [ANA (0.5-1 mg L<sup>-1</sup>), and AIA (0.54-0.93 mg L<sup>-1</sup>)] for four weeks. During proliferation, we established the conditions to increase the propagule multiplication rate to 2.3 shoots per explants after three weeks of culture in MS medium supplemented with sucrose (30 g L<sup>-1</sup>), activated carbon (1g L<sup>-1</sup>), BA (1-3 mg L<sup>-1</sup>), and ANA (0.5-1 mg L<sup>-1</sup>). Adventitious root formation was produced in 100% of explants after four weeks of incubation in MS medium with half strength of the original mineral formulation supplemented with sucrose (20 g L<sup>-1</sup>) and AIB (2 and 2.5 mg L<sup>-1</sup>). The survival rate of rooted plants was 100%. The micropropagation protocol obtained in this study provides the fundamentals to propagate this mexican orchid and may be considered a new propagation option in rescue and conservation programs.

**Index words:** orchid, threatened, asymbiotic germination, micropropagation, organogenesis.

## DEDICATORIA

A ti Julieta, mi ángel guardián que nunca te has alejado, tu que sufriste no solo nueve meses y al labor de parto, a ti madre que jamás me dejaste caer, diste todo y confiaste en mi, como en cada uno de tus hijos, este escalón es tuyo.

Para Areli, Uriel, Amira y Oralí, mis eslabones de hierro que han dado todo por mí y que el logro de uno, es logro de todos. Hermanos los amo y es para ustedes.

Farid, gracias por el café e invítame al barco de tus sueños, hemos navegado por el mar de lo desconocido, por todo lo que te he aprendido y lo que me he aprendido por estar a tu lado, gracias por ser y estar.

Josael, mi compañero y mi confidente, gracias por tu hombro por ser mi amigo, mi hermano.

Y a ti, solo tú sabes lo que hemos tenido que dejar, las veces que tropezamos, todos los obstáculos que se nos presentaron, tus risas y tus lágrimas, a ti Eliud, que de no haber querido no lo hubieras hecho, nos costó mucho.

## AGRADECIMIENTOS

A todos los Mexicanos y sus impuestos aportados, y que mediante el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) otorgaron mi beca de manutención.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo y al Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad – Fisiología Vegetal del Padrón Nacional de Postgrados de Calidad (PNPC), por brindarme la infraestructura para hacer esta investigación.

A la Dra. Cristy, por todas las pláticas, por la confianza, experiencias de vida, formación académica, enseñanzas personales y profesionales, a usted Dra. López-Peralta, no tengo como agradecer la confianza que me tuvo y ese “algo” que vio en mí.

Infinitamente agradecido por protegerme, orientarme y cuidarme como una madre en el paso por el colegio y todos los consejos que brindo de corazón.

Al Dr. Estrada Luna, por la orientación en mi tesis y apoyo durante mi formación.

A la Dra. Lucero del Mar Ruíz Posadas, por tenerme paciencia y por cada palabra idónea en momentos adecuados que me brindo, angelote de ojos hermosos que me bajo de las nubes y me ubico en mi camino.

Al Dr. Serafín Cruz Izquierdo, una mano que apareció cuando más lo necesitaba, apoyo emocional, económico, orientación académica, paño de lágrimas, por todas las palabras y momentos vividos, gracias por la confianza.

A Natalia y Marisa por cada momento compartido dentro y fuera del laboratorio. Y en especial a ti Laura Tovar, que fuiste mi instructora y que con paciencia, me apoyaste y enseñaste, no lo olvido, y que sin duda tu experiencia fue de gran ayuda.

A TODOS amigos-compañeros de generación y de oficina (Mari, Edith, Monse, Carmen, Mireya, Adriana, Betza, Eli, Gabi, Paty, Cynthia, Cesar, Moises, Dario, Osvin, Etel, Consuelo, Liz, Deysi, Paul, Yuri, Cipri, Marco, Román, a mi gordito preferido Oscar Antúnez Ocampo y de más que omití por nervios) cada platica y discusión hicieron mas ameno este camino.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	II
ABSTRACT .....	III
DEDICATORIA .....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
CONTENIDO.....	VI
ÍNDICE DE CUADROS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE .....	XI
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 PROBLEMÁTICA .....	2
1.2 JUSTIFICACIÓN .....	3
1.3 OBJETIVO GENERAL .....	4
1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
1.5 HIPÓTESIS .....	4
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>6</b>
2.1 GENERALIDADES DE LAS ORQUÍDEAS.....	6
2.1.1 Descripción botánica de las orquídeas .....	6
2.1.2 Importancia económica de las orquídeas.....	9
2.2 GENERALIDADES DE <i>BLETIA PURPUREA</i> .....	10
2.2.1 Importancia del género <i>Bletia</i> .....	11
2.2.2 Descripción de <i>Bletia purpurea</i> .....	11
2.3 CULTIVO DE ORQUÍDEAS.....	13
2.3.1 Requerimientos de cultivo.....	13
2.3.2 Plagas y enfermedades .....	15

2.3.3 Cultivo comercial.....	15
2.4 PROPAGACIÓN DE ORQUÍDEAS.....	16
2.4.1 Propagación sexual.....	16
2.4.2 Propagación asexual.....	16
2.5 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES <i>IN VITRO</i> .....	17
2.5.1 Totipotencia celular.....	17
2.5.2 Morfogénesis <i>in vitro</i> .....	18
2.6 FACTORES QUE AFECTAN LOS PROCESOS MORFOGÉNICOS <i>IN VITRO</i> .....	19
2.6.2 El explante.....	20
2.6.3 Medio de cultivo.....	21
2.6.4 Fitohormonas y reguladores de crecimiento.....	21
2.6.5 Antioxidantes y adsorbentes.....	23
2.6.6 Fuente de carbono.....	24
2.7 CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE ORQUÍDEAS.....	24
2.7.1 Medios de cultivo en orquídeas.....	25
2.7.2 Germinación <i>in vitro</i> .....	26
2.7.3 Propagación clonal.....	27
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	28
3.2 MEDIO DE CULTIVO Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN.....	28
3.3 ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO ASÉPTICO.....	29
3.3.1 Variables Cuantificadas.....	30
3.4 GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS <i>IN VITRO</i> .....	30
3.4.1 Inducción de germinación.....	30
3.4.2 Crecimiento de plántulas <i>in vitro</i> .....	31
3.5 REGENERACIÓN DE PLANTAS VÍA ORGANOGÉNESIS DIRECTA.....	31
3.5.1 Tipos de explante.....	31
3.5.2 Inducción de brotes.....	33
3.5.3 Multiplicación de brotes.....	35
3.5.4 Enraizamiento <i>in vitro</i> de plántulas.....	36
3.5.5 Aclimatación.....	37

<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>38</b>
4.1 ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO ASÉPTICO .....	38
4.2 GERMINACIÓN <i>IN VITRO</i> DE SEMILLAS.....	41
4.3 REGENERACIÓN DE PLANTAS VÍA ORGANOGÉNESIS DIRECTA .....	45
4.3.1 <i>Tipos de explante</i> .....	45
4.3.2 <i>Inducción de brotes</i> .....	47
4.3.3 <i>Multiplicación de brotes</i> .....	51
4.3.4 <i>Enraizamiento in vitro de plántulas</i> .....	54
4.3.5 <i>Aclimatación</i> .....	56
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	<b>58</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>59</b>
<b>VII. LITERATURA CITADA</b> .....	<b>60</b>
<b>VIII. APÉNDICE</b> .....	<b>75</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Suplementos orgánicos adicionados al medio de cultivo MS (1962) para evaluar la germinación de <i>Bletia purpurea</i> var. <i>purpurea</i> .....	30
Cuadro 2. Combinaciones de citocininas y auxinas y concentraciones del medio de cultivo evaluadas durante la etapa de inducción de brotes en diferentes explantes de <i>Bletia purpurea</i> var. <i>purpurea</i> .....	32
Cuadro 3. Concentración de sales del medio de cultivo MS (1962), sacarosa, auxinas y citocininas evaluadas en la inducción de brotes de <i>Bletia purpurea</i> var. <i>purpurea</i> a partir de explantes de pseudobulbo al azar de la zona apical, media o basal.....	34
Cuadro 4. Medio de cultivo MS (1962) adicionado con sacarosa (30 g L <sup>-1</sup> ), auxinas y citocininas evaluadas en la multiplicación de brotes de <i>Bletia purpurea</i> var. <i>purpurea</i> a partir de explantes de pseudobulbo. ....	35
Cuadro 5. Respuesta organogénica de explantes de pseudobulbo de <i>Bletia purpurea</i> var. <i>purpurea</i> sobre el medio MS a las cuatro semanas de cultivo. ....	46
Cuadro 6. Respuesta del explantes de pseudobulbo de <i>Bletia purpurea</i> var. <i>purpurea</i> en la fase de inducción de brotación. ....	48
Cuadro 7. Respuesta organogénica de segmentos de pseudobulbo durante la fase de multiplicación de brotes de <i>Bletia purpurea</i> var. <i>purpurea</i> después de tres semanas de cultivo.....	52
Cuadro 8. Respuesta de plántulas durante la fase de enraizamiento de plántulas de <i>Bletia purpurea</i> var. <i>purpurea</i> , en el medio MS al 50 % de sales, adicionado con sacarosa 20 g L <sup>-1</sup> y ácido indolbutírico (AIB), después de tres semanas de cultivo. ....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de una planta de <i>Bletia purpurea</i> . a) Hábito, b) Hoja. c) Inflorescencia.....	12
Figura 2. Pasos del tratamiento de desinfección superficial de cápsulas de <i>Bletia purpurea</i> var. <i>purpurea</i> .....	29
Figura 3. Morfología de una plántula de <i>Bletia purpurea</i> var. <i>purpurea</i> de seis meses de edad obtenida <i>in vitro</i> . ....	31
Figura 4. Plántula de <i>Bletia purpurea</i> var. <i>purpurea</i> obtenida <i>in vitro</i> donde se indican las zonas de disección para obtener los explantes. ....	32
Figura 5. Etapas del proceso metodológico para la regeneración <i>in vitro</i> de <i>Bletia purpurea</i> var. <i>purpurea</i> vía organogénesis directa.....	37
Figura 6. Semillas en la fase del establecimiento del cultivo aséptico de <i>Bletia purpurea</i> var <i>purpurea</i> . ....	38
Figura 7. Germinación de <i>Bletia purpurea</i> var. <i>purpurea</i> después de cuatro semanas de cultivo. ....	41
Figura 8. Germinación de semillas de <i>Bletia purpurea</i> var. <i>purpurea</i> en medio de cultivo MS (1962) después de cuatro semanas de cultivo.....	42
Figura 9. Respuesta de explantes de <i>Bletia purpurea</i> var. <i>purpurea</i> sobre el medio MS (1962) evaluando el tipo de explante, adicionando al medio dos concentraciones de BA (4.44 – 8.88 $\mu$ M) en combinación con ANA (10. $\mu$ M) y AIA (2.8 $\mu$ M), después de 4 semanas de cultivo.. ....	46
Figura 10. Brote adventicio de <i>Bletia purpurea</i> var. <i>purpurea</i> en explantes de pseudobulbo a los 7 días de cultivo en medio MS (1962) adicionado con 8.88 $\mu$ M de BA + 5.3 $\mu$ M de ANA.. ....	48
Figura 11. Brotes de <i>Bletia purpurea</i> var. <i>purpurea</i> en fase de multiplicación cultivados en un medio suplementado con 8.88 $\mu$ M de BA + 5.3 $\mu$ M de ANA. Br = Brote. ....	52
Figura 12. Plantas de <i>Bletia purpurea</i> var. <i>purpurea</i> a las siete semanas después de la aclimatación en mezcla de agrolita y peat moss. ....	57

## ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE

Apéndice 1. Composición del medio basal MS (Murashige y Skoog (1962). Ocupado para el establecimiento del protocolo de propagación <i>in vitro</i> de <i>Bletia purpurea</i> var. <i>purpurea</i> .....	75
Apéndice 2. Cuadros medios y su significancia del análisis de varianza de tratamientos en la fase de inducción de germinación <i>in vitro</i> de <i>Bletia purpurea</i> var. <i>purpurea</i> . .....	75
Apéndice 3. Cuadros medios y su significancia del análisis de varianza del tipo de explante en la fase de inducción de brotes de <i>Bletia purpurea</i> var. <i>purpurea</i> . ...	75
Apéndice 4. Cuadros medios y su significancia del análisis de varianza del explante en la fase de inducción de brotes de <i>Bletia purpurea</i> var. <i>purpurea</i> .....	76
Apéndice 5. Cuadros medios y su significancia del análisis de varianza en la fase de multiplicación de brotes de <i>Bletia purpurea</i> var. <i>purpurea</i> .....	76
Apéndice 6. Cuadros medios y su significancia del análisis de varianza de la fase de enraizamiento de brotes de <i>Bletia purpurea</i> var. <i>purpurea</i> .....	76

## I. INTRODUCCIÓN

La Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, tiene por objeto identificar las especies o poblaciones de flora y fauna silvestres en riesgo en la República Mexicana. La mayoría de las especies de la familia Orchidaceae han sido clasificadas bajo la categoría de protección especial (Pr); sin embargo, varias especies están incluidas en la categoría de amenazada (A), posiblemente extinta (E) y en peligro de extinción (P) (SEMARNAT, 2010). Muchas especies, se encuentran en alguna categoría de riesgo debido a la alteración de su hábitat, consecuencia de la modificación en su medio natural (Godo *et al.*, 2010).

Actualmente toda la familia se encuentra en un lugar del Libro Rojo de Datos elaborado por la Unión Internacional de Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (UICN). Las orquídeas se incluyen en el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) (Chugh *et al.*, 2009).

En algunas especies se han realizado innumerables estudios y publicado resultados para caracterizar su biología, ciclo de vida, cultivo y producción, sistemas de propagación, etc. Sin embargo, la mayoría de los miembros son desconocidos o poco se sabe de ellos. El desarrollo de protocolos eficientes son una valiosa opción para la propagación y conservación de especies vegetales (Deb y Temjensangba, 2006). Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, son una herramienta rápida para la propagación y conservación de orquídeas raras y amenazadas (Abraham *et al.*, 2012). Sus aplicaciones cada vez son más amplias y tiene gran potencial para la conservación de germoplasma (Sarasan *et al.*, 2006).

## 1.1 Problemática

Las especies de la familia orchidaceae se encuentran amenazadas constantemente por la modificación del ambiente natural donde crecen y que principalmente se debe a la deforestación. Otros factores que también afectan a las orquídeas son las plagas y enfermedades, el cambio de uso de suelo y problemas en la polinización y germinación (Flores *et al.*, 2008).

Se ha reportado que la destrucción del hábitat, la extracción desmedida y la deforestación han dado como resultado la reducción alarmante de las poblaciones naturales (Pradhan, 1985). Además, las orquídeas se caracterizan por presentar un crecimiento lento; para su propagación vegetativa, el número de ramificaciones y crecimiento secundarios son reducidos, como es el caso particular de los miembros del género *Phalaenopsis*, los cuales presentan hábitos de crecimiento monopodial (Arditti, 1984).

Un aspecto que caracteriza a las semillas de las orquídeas y que limita su éxito durante el establecimiento de las plántulas bajo condiciones naturales es que carecen de reservas metabólicas necesarias que le permitan obtener energía para comenzar el proceso de germinación (Arditti y Ghani, 2000). Aunado a esto, las semillas presentan baja viabilidad y asociación obligatoria con micorrizas para la germinación (Deb y Temjensangba, 2006). Las orquídeas de hábito terrestre presentan mayor dificultad para la germinación que las semillas que especies epífitas (Arditti y Ernst, 1984). Por otro lado, en ciertas especies los embriones no están formados completamente cuando el fruto alcanza la madurez fisiológica por lo que necesitan desarrollar completamente antes de iniciar la germinación; o bien, se encuentran en estado latente, lo cual impide el inicio del proceso germinativo (Iriondo y Pérez, 1999). La latencia del embrión es consecuencia de la presencia de inhibidores, por lo que el balance entre reguladores de crecimiento endógenos, inhibidores y promotores de la germinación es afectado por las condiciones ambientales externas que pueden llegar a romper la latencia (Bewley y Black, 1994).

Stewart y Kane (2006) señalan que para la conservación de orquídeas, la obtención de un protocolo asimbiótico eficiente para la germinación de manera *in vitro* y el aseguramiento de la sobrevivencia y crecimiento activo de las plántulas cuando se encuentran en la etapa de aclimatación después de la micropropagación son los obstáculos principales para obtener éxito. Aunado a los problemas de propagación, las orquídeas denotan un alto grado de endemismo lo cual las hace más vulnerables debido a la destrucción de sus hábitats por la quema y tala de los bosques (Condemarín-Montealegre *et al.*, 2007). Las orquídeas terrestres tienen una sensibilidad alta a cambios presentados en su entorno, por lo cual han sido objeto de conservación (Rasmussen, 1995).

## **1.2 Justificación**

En especies de orquídeas silvestres las estrategias de conservación son muy importantes, sobre todo porque las semillas resulta el material de propagación más adecuado cuando se trata de conservar la mayor diversidad genética posible de una especie o población. En especies que se encuentren en alguna categoría de riesgo, la utilización de germinación asimbiótica se ha convertido en una herramienta valiosa para conservar y reintroducir diferentes orquídeas (Pedroza-Manrique *et al.*, 2005; Deb y Temjensangba, 2006; Stewart y Kane, 2006).

Algunas orquídeas se consideran valiosos recursos genéticos debido a que tienen propiedades terapéuticas y producen compuestos para aliviar varios malestares (Deb y Temjensangba, 2006). Además de ser ampliamente apreciadas por sus flores de vistosos colores, formas, aroma y por la durabilidad de las mismas. Sin embargo, son plantas que requieren de condiciones especiales para su cultivo, floración y germinación de sus semillas (Condemarín-Montealegre *et al.*, 2007).

### 1.3 Objetivo general

- Establecer un sistema de regeneración *in vitro* de la orquídea *Bletia purpurea* var. *purpurea* vía organogénesis directa.

### 1.4 Objetivos específicos

- Establecer las condiciones de limpieza y óptima germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de *Bletia purpurea* var. *purpurea*.
- Definir las concentraciones hormonales y de medio de cultivo óptimas para la inducción y multiplicación de brotes vía organogénesis directa de *Bletia purpurea* var. *purpurea*.
- Determinar las condiciones de medio de cultivo y hormonales para el enraizamiento *in vitro* de brotes de *Bletia purpurea* var. *purpurea*.
- Establecer el proceso de aclimatación de plantas de *Bletia purpurea* var. *purpurea* obtenidas *in vitro* que asegure su sobrevivencia después del trasplante.

### 1.5 Hipótesis

- El proceso de germinación natural de las semillas de *Bletia purpurea* var. *purpurea* requiere del establecimiento de micorrizas con hongos del suelo, los cuales favorecen el suministro y la disponibilidad de nutrientes y posiblemente de otros compuestos químicos para activar al embrión en desarrollo, ya que las semillas no poseen ningún sistema de reserva. Sin esta estrategia natural para acceder a los nutrientes esenciales requeridos para la germinación y el crecimiento inicial de las plántulas sería imposible su establecimiento en condiciones naturales. La germinación asimbiótica de las semillas es una opción

que ha resultado exitosa en la germinación aséptica de varias especies y ha permitido la obtención de material vegetal sano para estudios diversos de morfogénesis *in vitro*. Dadas las características morfológicas de *Bletia purpurea* var. *purpurea* se considera que se puede lograr la germinación asimbiótica de las semillas para emplearlas como material donador de explantes para el establecimiento de un sistema de micropropagación.

- Las respuestas morfogénicas de los tejidos y órganos cultivados asépticamente son el resultado de la interacción del tipo de explante usado y su fisiología y diversos factores ambientales y los compuestos químicos adicionados a los medios de cultivo. Entre estos últimos, los reguladores del crecimiento son críticos, por lo que consideramos que el tipo y concentración podrían controlar el tiempo de respuesta y el desarrollo de estructuras organogénicas de los cultivos de *Bletia purpurea* var. *purpurea*. La organogénesis *in vitro* de esta orquídea es afectada en todas sus etapas por los componentes del medio de cultivo, hormonas y las condiciones de cultivo.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Generalidades de las orquídeas

Las orquídeas son un grupo amplio y diverso de plantas dentro de las angiospermas, las cuales representan aproximadamente el 10% del total de las especies vegetales y son consideradas plantas con flor de alto valor comercial (Cronquist, 1981; Dressler, 1981).

De acuerdo con Koopowitz (2001) la familia Orchidaceae comprende más de 20,000 especies, aunque algunos autores como Aguilar-Morales y López-Escamilla (2013) estiman que existen aproximadamente 35,000 especies en el mundo. Según Mejía (2015) existen 140,000 híbridos caracterizados por tener mucha variedad en colores de flores además de ser muy llamativos.

En México se reporta la presencia de alrededor de 1,254 especies de las 25,000 descritas en la familia Orchidaceae (Dixon *et al.*, 2003; Soto-Arena *et al.*, 2007). El 40% de las especies reportadas son consideradas endémicas (Espejo y López, 1998).

#### 2.1.1 Descripción botánica de las orquídeas

Las orquídeas son herbáceas perennes, epífitas o terrestres, a veces trepadoras, raramente subacuáticas o saprófitas. Su hábito de crecimiento es monopodial distinguido por inflorescencias laterales y el crecimiento apical continuo o simpodial con crecimiento limitado. Las raíces de las orquídeas son adventicias, suculentas o tuberosas a veces cubiertas por el velamen que es un tejido esponjoso, brillante o blanquecino (García-Cruz y Sosa, 1998).

En las orquídeas el tallo puede ser delgado, ocasionalmente suculento o modificado en rizoma, cormo o pseudobulbo, reducido dando a la planta una apariencia cespitosa. En las orquídeas simpodiales es característico el desarrollo de nuevos vástagos

provenientes de las zonas basales. Los pseudobulbos están compuestos por un solo entrenudo engrosado (heteroblástico) o por varios entrenudos (homoblástico) (García-Cruz y Sosa, 1998), los cuales poseen brácteas envainadoras papiráceas o coriáceas, a veces cubriendo por completo al pseudobulbo o cormo, foliáceas, raramente reducidas a escamas. Sus hojas son simples y enteras, pueden ser a veces plegadas, radicales o caulinares o modificadas a otras estructuras, muy variables en forma, carnosas, coriáceas o rígida, a menudo articuladas en la base y deciduas o raramente con una base envainadora. La inflorescencia de las orquídeas pueden ser en forma racemosa, paniculada, raramente compacta o las flores solitarias, generalmente pedunculada, terminal o lateral (García-Cruz y Sosa, 1998).

Las orquídeas tienen flores particulares, se clasifican en Monandrous, cuando sus estambres, estigmas y estilos se fusionan en un solo órgano, el ginostemo o columna lleva un solo estambre fértil cerca o en su ápice; en algunas otras los sépalos y pétalos son casi idénticos; otras veces el sépalo dorsal puede estar ligeramente diferente y el pétalo medio con frecuencia es modificado, para formar un labelo vistoso o labio. Cuando el ginostemo emerge, se localiza por debajo del labelo, sometido a la resupinación. O en las diandrous o Cyripedioideae, existe una estructura de escudo estaminoide, que es el resultado de la combinación de los órganos sexuales y se localiza en la parte superior mientras en la posterior está un estigma. Los estambres están a un lado de la unión del estigma y del estaminoide. Su sépalo dorsal es vistoso y el pétalo adquiere la forma de bolsa (Arditti, 1984).

Las flores presentan simetría bilateral (excepcionalmente el género *Mormodes*), generalmente resupinadas, ginándricas, por lo general perfecta raramente unisexuales y entonces las flores estaminadas muy diferentes de las pistiladas; ovario ínfero, uni o trilocular, el ovario pedicelado incluyendo al pedicelo propiamente y el ovario no desarrollado; perianto de dos verticilos alternos con tres segmentos, estos a menudos variadamente unidos; tres sépalos, coloreados o foliáceos, similares o el dorsal diferente, el par lateral a menudo unido, algunas veces prologados en un mentón en la base, generalmente valvados en prefloración, raramente profundamente lobulados;

perianto interno de tres segmentos, los dos laterales o pétalos son similares y el tercero, el labelo, que es diferente (García-Cruz y Sosa, 1998).

El labelo a menudo está muy modificado; puede ser entero o lobulado, a veces muy succulento; generalmente parcialmente unido a la columna, raramente articulado y móvil, la porción basal, central y distal del labelo muy variables, a veces diferenciándose en hipoquilo, mesoquilo y epiquilo, respectivamente, la superficie superior del labelo con un disco provisto de lamelas, crestas, hendiduras o placas, constituyendo el callo, la base del labelo a menudo proyectada en un nectario o espolón (García-Cruz y Sosa, 1998). Su columna (ginandrio o ginostemo) está formada por la consolidación de los estambres y el estilo. Normalmente es succulenta, asimétrica, con una antera fértil en el ápice (dos cerca del ápice en el género *Cypripedium*), alada a veces prolongada ventralmente hacia el labelo en una porción estéril o pie, a la que se une el labelo, la base a veces con un cojinete ventral o una palca de tejido o tábula infraestigmática (García-Cruz y Sosa, 1998).

El estigma trilobulado, dos de los lóbulos por lo general confluentes y fértiles, el tercero frecuentemente más largo que los otros, fértil o estéril y a menudo modificado en un rostelo, formando una unidad para la transferencia de polen o polinario (García-Cruz y Sosa, 1998). La antera se encuentra detrás del rostelo, en una cavidad profunda o clinandrio; erecta y paralela a la columna o doblada a lo largo del ápice de la columna (incumbente y operculada o dorsal sobre la porción apical de la columna), a veces la base de la antera completamente unida a la columna (García-Cruz y Sosa, 1998).

El polen (con excepción de *Cypripedium*) consolidado en 2, 4, 6 u 8 masas de polen o polinios, suaves, farinosos o duros, uniformes en estructura o subdivididos en fragmentos (séctiles), desnudos o prolongados en un caudículo por el que el polinio se une al viscidio; viscidio a veces con un estipe derivado de la columna. Su polinario constituido por los polinios de una sola antera, el viscidio o el viscidio y el estipe (García-Cruz y Sosa, 1998).

El fruto es una cápsula que abre a lo largo de 1, 2, 3 o 6 suturas longitudinales, las valvas por lo general permaneciendo unidas al ápice después de abrir. Las semillas por lo regular diminutas, casi siempre de menos de 5 mm de largo, muy numerosas, carentes de endospermo, con una cubierta papirácea alrededor del embrión con muy variadas ornamentaciones, requiriendo de la simbiosis con un hongo micorrízico para su germinación de forma natural (García-Cruz y Sosa, 1998; Thomas y Michael, 2007).

### **2.1.2 Importancia económica de las orquídeas**

Las orquídeas son una de las familias botánicas de mayor demanda entre las plantas ornamentales (Rodríguez *et al.*, 2005). Los principales productores de orquídeas en macetas en el mundo son Taiwán, Tailandia, Reino Unido, Italia, Japón, Nueva Zelanda y Brasil. En contraparte, Estados Unidos es considerado el principal importador (Chugh *et al.*, 2009). La principal característica de interés para su cultivo son sus flores que le otorgan un gran valor ornamental (Cheruvathur *et al.*, 2010). Los horticultores y vendedores han explotado, y en algunos casos sobrexplotado, las orquídeas por la belleza exótica que representan sus flores caracterizadas por su morfología, durabilidad y colorido (Thomas y Michael, 2007) o por su follaje (Mary y Divakar, 2015).

En este grupo ornamental se han obtenido numerosas variedades mediante cruces interespecíficas e intergenéricas que dan como resultado gran diversidad de formas y colores de flores (Godo *et al.*, 2010). La posibilidad de obtener gran cantidad de plantas al año, a partir de los cuerpos parecidos a protocormos (PLBs), ha despertado gran interés entre los cultivadores y la industria ornamental (Chugh *et al.*, 2009).

La tribu Maxillarieae agrupa aproximadamente 164 géneros, que constituyen elementos importantes de la orquideoflora de América tropical, gran parte de sus especies son vistosas y con importante valor hortícola, como algunas especies de los géneros *Oncidium*, *Brassia*, *Lycaste* y *Rhynchostele* (Jiménez, 2001).

En Japón el género *Calanthe* comprende aproximadamente 200 especies, con una amplia gama de colores y fragancias agradables (Godo *et al.*, 2010). El género *Cymbidium* constituye 50% de las plantas micropropagadas de clima templado, tiene importancia comercial como planta en maceta y flor de corte y por ello sus híbridos son altamente demandados (Vyas *et al.*, 2010).

## 2.2 Generalidades de *Bletia purpurea*

La especie *Bletia purpurea* (Lam.) DC incluye tres variedades: var. *alba* Ariza Julia & J. Jiménez Alm., var. *pittieri* Schltr. y var. *purpurea* (Trópicos, 2016). La clasificación taxonómica es la siguiente:

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
- Superorden: Liliales Takht.
- Orden: Asparagales Link.
- Familia: Orchidaceae Juss.
- Subtribu: Bletinae Benth.
- Género: *Bletia* Ruiz & Pav. (Trópicos, 2016)

El género *Bletia* Ruiz & Pav agrupa a 35 especies aproximadamente, se trata de orquídeas de hábito terrestre neotropical (Dressler, 1968; Sosa, 1994a; 1994b). La especie *B. purpurea* (Lam.) D.C. se distribuye desde el sur de Florida en Estados Unidos, México y América Central hasta Colombia, Brasil, Ecuador, Venezuela, Perú y las Islas Antillas. Son plantas de hábitats diversos ya que pueden crecer entre pastizales, sobre laderas empinadas, bajas o medianas elevaciones, en lugares muy húmedos, zonas inundables, o en zonas más secas, en bosques de pino, bosques de pino-encino (Dunsterville y Garay, 1961; Luer, 1972; Williams & Allen, 1980; Ames y Correll, 1985; McVaugh, 1989; McLeish *et al.*, 1995; Sosa y Díaz-Dumas, 1998).

### **2.2.1 Importancia del género *Bletia***

De acuerdo con un estudio realizado por Palestina y Sosa (2002), donde se analizaron poblaciones de la especie *Bletia purpurea*, se registró la presencia de ejemplares en los estados de Veracruz, Querétaro, Jalisco, Michoacán, Morelos, Quintana Roo, Tabasco y Chiapas. Para la especie se reportan usos medicinales; algunas de ellas indican que los pseudobulbos frescos se aplicaban en quemaduras y heridas (Correll, 1978; Lewis, 1977) y los pseudobulbos secos, se usan para preparar infusiones que aliviaban problemas estomacales e intoxicación por ingesta de pescado (Correll, 1978).

### **2.2.2 Descripción de *Bletia purpurea***

Las plantas del género *Bletia* son hierbas terrestres, erectas; con pseudobulbos subglobosos, epigeos o hipogeos, ocasionalmente tuberosos; pocas hojas (o sin ellas en la floración), plicadas, pecioladas, articuladas; inflorescencia racemosa, los escapos laterales sobre los pseudobulbos, sin hojas; sépalos subiguales, libres o los laterales un tanto connatos y gibosos en la base; los pétalos similares al sépalo dorsal; labelo libre, erecto, entero o lobado, la base usualmente contraída, ocasionalmente gibosa; lóbulos laterales usualmente anchos, paralelos o con las puntas extendidas; lóbulo medio erecto o recurvado, a menudo retuso o bilobado; disco usualmente lamelado; columna elongada, subterete, alada, a menudo con dos aurículas en la base, sin base o con base corta; antera operculada, incumbente; ocho polinias, cerosas; fruto cápsula cilíndrica a elipsoidal (McVaugh, 1985).

La morfología de esta especie es variable, tanto en número de hojas como color, tamaño y cantidad de flores por inflorescencia (Figura 1). Las flores autógamas de *Bletia purpurea* son blancas, los polinios que germinan directamente en el estigma y son de tamaño variable (Palestina y Sosa, 2002).

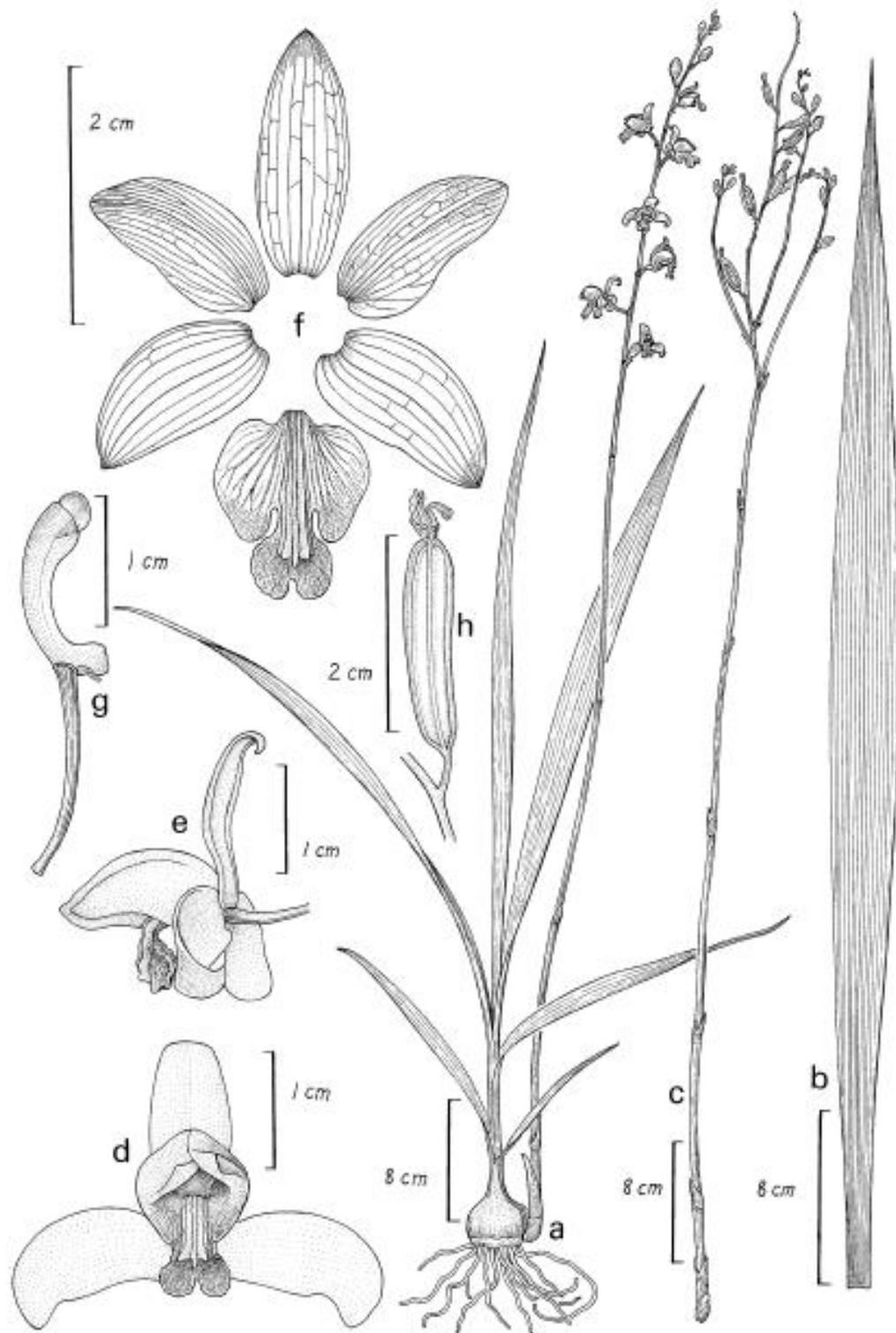


Figura 1. Morfología de una planta de *Bletia purpurea*. a) Hábito, b) Hoja. c) Inflorescencia. d) Vista frontal de la flor. e) Vista lateral de la flor. f) Sépalos, pétalos y labelo. g) Columna. h) Cápsula. (Palestina y Sosa, 2002).

## **2.3 Cultivo de orquídeas**

Las orquídeas se pueden propagar mediante división de tallos y por semillas principalmente. Cuando se parte de semillas la germinación se puede llevar a cabo de forma simbiótica o asimbiótica. Las semillas, plantas jóvenes o adultas de orquídeas hacen simbiosis con hongos, los cuales utilizan los nutrientes y se convierten en un factor ecológico importante en la diversidad, ya que minimizan la competencia interespecífica (Nikabadi *et al.*, 2014).

Un gran número de productores e investigadores han empleado hongos simbióticos para la propagación de orquídeas. Esto contrasta con el cultivo de muchas orquídeas epífitas tropicales que, en general, son relativamente fáciles de germinar en condiciones asimbióticas. En consecuencia, los productores de orquídeas tropicales no utilizan la germinación simbiótica para su propagación. Por estas razones se conocen mucho mejor las interacciones simbióticas de germinación de las orquídeas terrestres de zonas templadas que las de orquídeas epífitas tropicales. Sin embargo, las técnicas de germinación simbiótica de semillas epífitas tropicales podrían mejorar el éxito de cultivo de estas orquídeas tanto para fines comerciales como de conservación (Condemarín-Montealegre *et al.*, 2007; Ospina y Bayman, 2009).

La Sociedad Estadounidense de la Orquídea (American Orchid Society; AOS, 1988) señala que las orquídeas, como cualquier otra planta, pueden cultivarse con buen éxito si se les proporcionan el cuidado y condiciones apropiadas de luz, temperatura, humedad, ventilación, fertilización y control fitosanitario. Las condiciones de luz y temperatura que experimentan las semillas al momento de su germinación en campo, tienen un papel importante para el establecimiento de las plántulas (Pons, 2000).

### **2.3.1 Requerimientos de cultivo**

Aunque la información del cultivo comercial de las orquídeas es amplia, la referente al cultivo de especies silvestres es limitada. Por ejemplo, la dificultad en la medición de

las demandas minerales y la desigualdad de requerimientos restringe los estudios de necesidades nutricionales (Benzing, 1990).

Las orquídeas en su hábitat natural tienen un óptimo para desarrollarse a plenitud. Pero el mantenimiento de las mismas en colecciones o viveros requiere de un plan de manejo, así como una atención constante. Para que las plantas no se deterioren se necesita del tiempo, el conocimiento, recursos humanos y económicos apropiados (Salazar-Casasa *et al.*, 2007).

Luz: Las orquídeas requieren la mayor luz posible sin lesionar la planta, ya que es necesaria para el óptimo crecimiento. El exceso de luz puede originar la decoloración de las hojas hasta tornarlas amarillentas; la poca luz produce un tono verde oscuro en la hoja, impidiendo el desarrollo y reduciendo o anulando la floración (AOS, 1988). Se recomienda tener la luz solar indirecta y las planta estar orientada hacia el norte o este (Mejía, 2015).

Temperatura: Las orquídeas necesitan temperaturas diurnas de 24 a 29°C y por la noche 16°C, dependiendo de las necesidades particulares de ciertas especies. (AOS, 1988). En *Cattleya* las temperaturas pueden oscilar entre 12 y 30 °C, pero no inferiores a los 12 °C (Fischer, 2007). Por otra parte, *Phalaenopsis* tiene un rango de temperatura óptimo de 17 a 23 °C y no inferior a 8 °C (Mejía, 2015).

Humedad relativa: Las orquídeas demandan un ambiente húmedo, se recomienda generalmente un rango de 40 y 60% de humedad relativa; no prosperan en un ambiente excesivamente húmedo y sofocante. En la naturaleza las orquídeas se refrescan periódicamente con las lluvias y se secan con las brisas. Estas condiciones son las que se deben reproducir para implementar su cultivo; generalmente 50% es un porcentaje óptimo (AOS, 1988, Mejía, 2015).

Fertilización: Para obtener los mejores resultados se recomiendan aplicaciones semanales de una dilución a la mitad de la proporción recomendada, de casi todas las

fórmulas comerciales (AOS, 1988), Zeng *et al.* (2011) en *Nothodoritis zhejiangensis* Zeng *et al.* (2012) en *Paphiopedilum wardii*, ocuparon una fertilización semanal con 150 mg L<sup>-1</sup> de Peters Professional 20-20-20<sup>®</sup> (20N-20P-20K). Bello-Bello *et al.* (2015), recomienda la fertilización foliar (Fertiplus<sup>®</sup>) una vez por semana durante un mes.

Riego: Por ejemplo para la *Cattleya* debe ser abundante, pero en temporadas frías debe de ser espaciado (Fischer, 2007) por lo regular son tres veces por semana (Bello-Bello *et al.*, 2015), pero dependerá del ambiente, las dimensiones de maceta, sustrato, especie y el clima donde se encuentre (Mejía, 2015).

### **2.3.2 Plagas y enfermedades**

En las orquídeas se ha reportado la presencia de hongos, bacterias, virus y nematodos además del pulgón de las orquídeas (*Cerataphis orchidearum*), escamas protegidas (*Diaspis boisduvalii* y *Furcaspis biformis*), avispa del brote (*Eurytoma orchidearum* y *Eurytoma* sp.), avispa de la raíz, termitas (*Rugitermes bicolor*), hormigas (*Pheidole* sp., *Leptoglossus* sp.), picudo de las flores (*Stethobaris* sp.) y otros de importancia secundaria como abejas carpinteras (*Xylocopa* sp.) y caracoles (Ángel *et al.*, 2001).

### **2.3.3 Cultivo comercial**

En cuanto a la producción comercial de orquídeas, existen pocos invernaderos especializados en el cultivo de estas plantas en México, lo que ocasiona que la demanda no se cubra. Las orquídeas reproducidas en invernadero se comercializan en grandes cantidades, sin embargo, existe un menor pero significativo porcentaje de prácticas comerciales de tráfico ilegal. El Distrito Federal, Estado de México, Oaxaca y Veracruz se identifican como los principales estados productores de orquídeas (CONABIO, 2005; SAGARPA *et al.*, 2005).

El rendimiento de los cultivos depende fundamentalmente de la tasa de multiplicación de cada especie y del método de propagación empleado (Torres y Mogollón, 2000).

## **2.4 Propagación de orquídeas**

### **2.4.1 Propagación sexual**

Arditti (1990) indica que la reproducción sexual de las orquídeas es una propagación generativa; por medio de las semillas en pocas ocasiones se obtiene una descendencia semejante a los padres y esta respuesta se observa más en el caso de especies silvestres. En orquídeas cultivadas (generalmente obtenidas por cruce “híbrido” y fuertemente heterocigoto), el uso de semilla producirá una progenie muy heterogénea y rara vez idéntica al material inicial.

Withner (1980) indica que las plantas se pueden multiplicar de dos maneras: vía sexual (semilla) y asexual (vegetativamente). Los dos tipos de propagación pueden resultar ineficientes si no se proporcionan las condiciones adecuadas. Cuando no se forman semillas o se forman muy pocas, éstas pierden rápidamente su viabilidad y la reproducción sexual no es satisfactoria; en esos casos la única opción es la multiplicación vegetativa.

### **2.4.2 Propagación asexual**

Las orquídeas pueden ser propagadas vegetativamente mediante la división de plantas, es el método que asegura la descendencia idéntica a la planta madre, pero es muy limitada la cantidad de plantas obtenidas, además necesita mucho tiempo (Arditti, 1990). Aunque algunas variedades son fácilmente reproducibles vegetativamente, por esquejes o divisiones convencionales, las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* pueden utilizarse de manera óptima para mejorar las tasas de multiplicación (Murashige, 1974).

En la orquídea *Rhynchostylis retusa*, Thomas y Michael (2007) observaron desventajas en su reproducción vegetativa debido al crecimiento lento y la poca división de pseudobulbos. Estas características son limitantes que se reflejan en una tasa de

reproducción baja, para el cultivo comercial de esta especie fue necesario desarrollar un procedimiento de propagación eficiente *in vitro*.

## **2.5 Cultivo de tejidos vegetales *in vitro***

El término cultivo *in vitro* abarca un amplio rango de técnicas bajo condiciones estrictamente asépticas (Fay, 1994).

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* son una herramienta biotecnológica que entre muchas aplicaciones ha facilitado la propagación y conservación de diferentes especies; incluidas plantas ornamentales, forestales, frutales, entre otras (Irrondo- Alegría, 2001; Flores-Escobar *et al.*, 2008).

La investigación en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* puede cubrir un rango amplio de actividades; por ejemplo desde la investigación básica sobre los procesos bioquímicos y morfológicos de la diferenciación celular, hasta la investigación aplicada y al desarrollo de tecnologías para la propagación clonal o mejoramiento genético de plantas (Mroginski y Roca, 1991).

La micropropagación ofrece la posibilidad de clonación de plantas seleccionadas y producirlas a gran escala mediante las técnicas de cultivo de tejidos (Yanelly *et al.*, 2010). En este aspecto podemos encontrar a la Capa Fina de Células, TCL por sus siglas en inglés, es una de las técnicas *in vitro* utilizada para la regeneración de plantas. Los explantes pequeños, de diferentes órganos de la planta, pueden ser disecados de forma longitudinal (ITCL) o transversal (tTCL). En la primera forma, las capas finas solo contienen un tipo de células mientras en el segundo se obtienen células de diferentes tipos de tejidos (Tran, 1981).

### **2.5.1 Totipotencia celular**

Es denominada la capacidad de cualquier célula de la planta, para regenerar la estructura completa de un individuo, debido a que contiene la información genética

necesaria (Tapia y Monroy, 2007; López *et al.*, 2008; Azcón-Bieto y Talón, 2013). En cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, la totipotencia celular da la capacidad a la célula de diferenciar los meristemas adventicios y regenerar nuevos órganos (Azcón-Bieto y Talón, 2013).

## **2.5.2 Morfogénesis *in vitro***

Tran (1981), se refiere al término morfogénesis como la formación de nuevas estructuras con funciones conocidas y desconocidas o estructuras como callos o pelos unicelulares.

Puede definirse como la génesis o iniciación de la forma y función de organismos vivos. El objetivo fundamental es identificar los procesos moleculares, bioquímicos y fisiológicos que conducen a la aparición de nuevas estructuras organizadas en el cuerpo de la planta. Tomando como base estos tres aspectos, se define como el desarrollo junto con el control del crecimiento celular y la diferenciación celular (Pierick, 1990; Taiz y Zeiger, 2010, Azcón-Bieto y Talón, 2013).

La morfogénesis *in vitro* se lleva a cabo mediante la utilización de las técnicas del cultivo de tejidos vegetales, en las cuales los cultivos se mantienen bajo condiciones controladas de asepsia, en un medio de cultivo artificial, con el balance de hormonas y otros suplementos inorgánicos y orgánicos. También se tiene estricto control de los factores ambientales que influyen en la generación del óptimo desarrollo, a fin de lograr las respuestas morfogénicas requeridas a partir del explante. La morfogénesis *in vitro* puede seguir dos rutas: la organogénesis y embriogénesis somática (Laux y Jürgens, 1997).

### **2.5.2.1 Organogénesis *in vitro***

Esta respuesta morfogénica se ve afectada principalmente por las condiciones del medio de cultivo (Mukherjee *et al.*, 1991), sin embargo se debe de considerar que es el

resultado de la interacción entre el explante, el medio de cultivo, las condiciones ambientales y las fitohormonas (Azcón-Bieto y Talón, 2013). Como resultado es la formación de brotes en un explante y puede lograrse de forma directa o indirecta. Las células somáticas del explante pueden regenerar una planta completa en la organogénesis directa. En la organogénesis indirecta interviene una fase de callos y la posterior formación de brotes (Krikorian y Roca, 1991).

### **2.5.2.2 Embriogénesis somática**

La embriogénesis somática se define como el proceso por el cual células somáticas haploides o diploides se desarrollan en plantas diferenciadas pasando por las etapas características embriológicas sin que exista la fusión de gametos (Williams y Maheswaran, 1986; Chugh y Khurana, 2002; Fehér, 2005; Ikeda *et al.*, 2006).

La regeneración de plantas *in vitro* vía embriogénesis somática es un prerrequisito indispensable para la aplicación de algunas herramientas de la biotecnología en la mejora genética de las plantas (Hernández *et al.*, 2010).

La embriogénesis somática simula la embriogénesis cigótica y puede variar considerablemente entre las especies, pero en general es bastante similar. La embriogénesis somática puede lograrse por dos rutas: directa, donde los embriones se forman directamente en el explante, e indirecta, donde se presenta una fase de callos previa a la formación de los embriones (Krikorian y Roca, 1991).

### **2.6 Factores que afectan los procesos morfogénicos *in vitro***

La morfogénesis *in vitro* depende de la capacidad de las células somáticas, particularmente de las presentes en los tejidos parenquimatosos, para regenerar una planta completa (Laux y Jürgens, 1997).

Algunos factores importantes para la morfogénesis son las concentraciones y tipos de fitohormonas, comúnmente citocininas y auxinas, la fuente y concentración del nitrógeno y algunas otras sustancias como la sacarosa (Villalobos y Thorpe, 1991). La producción de brotes adventicios varía de genotipo a genotipo (Cousineau y Donnelly, 1991; Turk *et al.*, 1994; Graham *et al.*, 1997).

Es por ello que se deben de diseñar protocolos individuales de regeneración, propios para la especie o cultivar que se ocupa con base en experimentos propios (Zawadzka y Orlikowska, 2006).

### **2.6.2 El explante**

La elección del explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; la elección estará determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada (Mroginski y Roca, 1991). Pueden ser muy variados y disecados a partir de tallos (nodal e internodal), yemas axilares, hojas, ápices o meristemas apicales, protoplastos, raíces, pedicelos y flores (Valle-Sandoval *et al.*, 2008).

Cuando se desea mantener la diversidad en plantas el material a utilizar deben ser las semillas; sin embargo, si la forma de propagación no es la apropiada o que las semillas no sean viables, se opta por usar alguna otra parte de la planta que tenga actividad meristemática (Fay, 1994). Existen reportes que siendo el mismo origen del explante, pero de diferente edad fisiológica, muestra diferencia al medir la respuesta morfogénica (López-Gómez *et al.*, 2010).

Valle-Sandoval *et al.* (2008), reportaron que los segmentos de tallo en *Dendranthema X grandiflorum*, se oxidaron debido a que el tamaño era menor, comparado con otros explantes disecados de otros segmentos de tallo.

### **2.6.3 Medio de cultivo**

El medio de cultivo debe ser acorde a cada especie, porque es el soporte que proporciona los nutrientes necesarios para su desarrollo (Tadeu *et al.*, 2002). Debido a la composición de iones presentes en el medio de basal del MS (Murashige y Skoog, 1962), lo hacen idóneo para cubrir las demandas nutrimentales de diversos cultivos (Krikorian y Roca, 1991). Sin embargo se han probado de forma *in vitro* y en diferentes especies, varios medios para la obtención de una respuesta morfogénica, entre estos se encuentran el SH (Shenk y Hildebrandt, 1972), B5 (Gamborg *et al.*, 1968), GD (Gresshoff y Doy, 1974), KM (Kao y Michayluk, 1975), LM (Litvay *et al.*, 1985), NN (Nitsch y Nitsch, 1969) SI (Franklin *et al.*, 1991), LS (Linsmaier y Skoog, 1965) y el Wh (White, 1963).

### **2.6.4 Fitohormonas y reguladores de crecimiento**

Azcón-Bieto y Talón (2013) mencionan que las fitohormonas son sustancias orgánicas que se sintetizan en la planta, que en concentraciones más bajas que los nutrientes o vitaminas, tienen la capacidad de afectar procesos fisiológicos, además de contar con una reacción primaria que desencadena eventos internos y producir un efecto fisiológico. Su acción repercute en otro sitio de la biosíntesis pero también puede ser la acción con efecto local.

Todas las células vegetales tienen la capacidad de sintetizar hormonas, sin embargo, las de mayor actividad son las de zonas meristemáticas en tallos y raíces, primordios de órganos en partes vegetativas o reproductoras y en semillas. El efecto en la respuesta hormonal está ligada a la concentración y la sensibilidad y ésta a su vez es dependiente al genotipo, tejido, edad, el estado fisiológico de la planta, las condiciones ambientales y la presencia o ausencia de otras hormonas (Azcón-Bieto y Talón, 2013).

En algunos casos, las respuestas deseadas en los cultivos *in vitro* se obtienen sólo con el empleo del medio de cultivo basal; sin embargo, en la mayoría de las investigaciones

es necesario agregar fitohormonas al medio, generalmente auxinas y citocininas (Krikorian y Roca, 1991). Sin embargo, ninguna hormona tiene el control absoluto de un proceso fisiológico, es así que se debe considerar la interacción positiva o negativa entre las hormonas presentes (Azcón-Bieto y Talón, 2013).

En general, se reconocen cinco grupos de fitohormonas, que son las auxinas, citocininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico (Azcón-Bieto y Talón, 2013). El grupo de las auxinas y citocininas, son frecuentemente usadas, de forma individual o combinadas, por sus efectos en la morfogénesis *in vitro* (De Pauw *et al.*, 1995).

Las auxinas son responsables del alargamiento o elongación celular, además de participar en diversos procesos como la división y diferenciación celular, la formación de raíces adventicias, la dominancia apical o en el desarrollo de frutos. (Azcón-Bieto y Talón, 2013), además de tener un papel importante en la polaridad de la planta (George *et al.*, 2008). Las auxinas que más se utilizan en el establecimiento de los cultivos *in vitro* son: 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA), Ácido Indol-3-acético (AIA) y ácido indolbutírico (AIB) (Krikorian y Roca, 1991).

Las giberelinas actúan como alargadores de tallos, participan en el desarrollo y maduración de fruto, la germinación y en el crecimiento vegetativo o reproductivo de la planta, además de influir en la inducción de la floración. Entre otros efectos se encuentra la activación de la división celular, extensibilidad de la pared celular, la disposición trasversal de los microtúbulos y el transporte del calcio (Azcón-Bieto y Talón, 2013).

Las citocininas son las fitohormonas encargadas de regular la división celular, ruptura de dominancia apical, organogénesis *in vitro*, senescencia foliar, floración y desarrollo de cloroplastos. Son sintetizadas principalmente en meristemas de raíces o tejidos meristemáticos aéreos, en el endospermo o eje embrionario, su función principal es el mantenimiento de los meristemas aunque pueden ser mensajeros del estado nutritivo de las raíces y repercutir en el desarrollo de las mismas o de los tallos. El rol de las

citocininas, está ligado en la iniciación de los primordios foliares y la posición en la que emergen (Azcón-Bieto y Talón, 2013). Las citocininas más comunes ocupadas de forma *in vitro* son 6-furfurilaminopurina (KIN), 6-benzilamino-purina BAP y zeatina (ZEA) (Krikorian y Roca, 1991).

El etileno es una fitohormona que participa en diferentes etapas del desarrollo de la planta, está presente durante la germinación, la maduración, senescencia o respuesta al estrés. Algunas respuestas que se pueden atribuir al etileno son el engrosamiento del hipocótilo, cambio en la orientación del desarrollo y reducción de la elongación; estas características ayudan en la germinación al proteger el meristemo y apoyan cuando emerge del suelo (Azcón-Bieto y Talón, 2013).

El ácido abscísico (ABA) es conocido por su acción en el crecimiento vegetal y se encuentra en todos los tejidos vegetales, algunas cianobacterias, musgos, hongos fitopatógenos y algas verdes. Controla el desarrollo embrionario; mitosis, expansión y diferenciación celular, reservas de proteínas, almidón y grasas. Está relacionado en plantas superiores, con el estrés hídrico, mecánico, salino, térmico y el cierre de estomas; inicia la síntesis de proteínas implicadas en la tolerancia y reduce la transpiración como mecanismos para evitar la desecación (Azcón-Bieto y Talón, 2013).

Los reguladores de crecimiento son sustancias naturales o sintéticas que en concentraciones altas, pueden ser letales para la planta. La adición en su forma sintética a cultivos, ha mostrado mejoras y modificaciones en el desarrollo de las plantas (Azcón-Bieto y Talón, 2013).

### **2.6.5 Antioxidantes y adsorbentes**

Los antioxidantes son compuestos que reaccionan o controlan la concentración de compuestos reactivos de oxígeno y nitrógeno, convirtiéndolas en formas no tóxicas o evitando el efecto oxidativo en las células (Azcón-Bieto y Talón, 2013).

La adición de carbón activado a los medios puede tener múltiples beneficios en los cultivos *in vitro*, por ejemplo proporciona un ambiente oscuro (Dumas y Monteuis 1995). El carbón activado mostró en el cultivo de protoplastos ser benéfico al absorber las sustancias tóxicas durante el aislamiento y mantener poblaciones de células sanas (Neumann *et al.*, 2009).

### **2.6.6 Fuente de carbono**

Los sistemas *in vitro* dependen de la adición de luz y de fuente de carbono exógenos demandados por los órganos o tejidos, a diferencia de los sistemas *in vivo* (Tran, 1981). La adición de sacarosa al medio de cultivo, provee de una fuente de carbono y de energía necesaria para los tejidos vegetales (Hall, 2000; De Faria *et al.*, 2004; Neumann *et al.*, 2009), además de ser comúnmente la fuente de carbohidrato empleado en el cultivo de células y tejido, regula la asimilación de carbón inorgánico y la diferenciación embriogénica (Neumann *et al.*, 2009).

### **2.7 Cultivo *in vitro* de orquídeas**

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* pueden contribuir a la conservación de las orquídeas (Flores-Escobar *et al.*, 2008). Usando esta herramienta biotecnológica, se pueden proteger orquídeas endémicas o en peligro de extinción (Pedroza-Manrique *et al.*, 2005). Sus aplicaciones abarcan desde el aumento de la tasa de germinación, el rescate de embriones y la micropropagación (Flores-Escobar *et al.*, 2008). La propagación mediante las técnicas de cultivo *in vitro* a larga escala también brinda un beneficio para las orquídeas y su conservación *ex situ* (Condemarín-Montealegre *et al.*, 2007; Chugh *et al.*, 2009).

Cuando la propagación por semilla de orquídeas no es viable o se desea propagar un determinado genotipo, se recurre a las técnicas convencionales de propagación vegetativa a través de la división continua de pseudobulbos o a la micropropagación.

Las técnicas de micropropagación representan muchas ventajas; principalmente porque se requiere de poco material vegetativo para iniciar los cultivos (Fay, 1994), las altas tasas de multiplicación que se consiguen y la obtención de plantas libres de virus o enfermedades (Iriondo, 2001).

La propagación clonal muestra una gran ventaja en la industria hortícola, debido a la producción de flores uniformes durante periodos específicos de demanda comercial (Chugh *et al.*, 2009). La obtención de una plántula de orquídea, se establece en tres fases sucesivas, la primera es la germinación, seguida de la formación de cuerpo parecidos a protocormos PLBs (Protocorm Like Bodies) por sus siglas en inglés, y por último el desarrollo de las plántulas (Thomas y Michael, 2007).

### **2.7.1 Medios de cultivo en orquídeas**

La primera aportación al cultivo de orquídeas mediante la germinación asimbiótica, fue con los medios nombrados Knudson B (KB) y Knudson C (KC) publicados en los años 1922 y 1946 respectivamente, logrando el uso para la micropropagación en años posteriores (Arditti y Krikorian, 1996). Aunque Domokos (1976) menciona que la primera vez que se germinaron orquídeas fue por María Galambos, en un medio con composición similar a las de Knudson B y C en el año 1914 (Arditti, 1984).

Hasta la fecha se han probado diferentes medios con variaciones en concentraciones y composiciones dependiendo de la especie. Algunos ejemplos son el MS (Murashige y Skoog, 1962), VW (Vacin y Went, 1949), MM (Malmgren, 1996), PhytoTechnology Orchid Seed Sowing Medium (P723; Johnson *et al.*, 2007), Harvais medium (Harvais, 1982), *BM1* terrestrial orchid médium (BM1; Van Waes y Debergh, 1986), Lucke (L; Anderson, 1996), LM (Lindemann *et al.*, 1970), Phytamax® (Sigma® – P0931), Robert Erast (RE; Arditti, 1982), Thomale GD (Thomale, 1954), Hyponex N016 (Zeng *et al.*, 2011), B141 (PhytoTechnology Laboratories, Shawnee Mission, KS; Kauth *et al.*, 2011) O753 (phytotechnology médium; Asghar *et al.*, 2011) y New Dogashima (Tokuhara y Mii, 1993).

### 2.7.2 Germinación *in vitro*

Richter (1971) estableció que la técnica de cultivo de semillas *in vitro* tiene una importancia fundamental en la obtención de nuevas plantas de híbridos. Este método se ha convertido en un procedimiento ampliamente utilizado y de rutina para el rescate de embriones que normalmente no crecen ni se convierten en plántulas; es decir, el material no se está multiplicando clonalmente, pero si se está multiplicando el germoplasma que se perdería en condiciones naturales.

La germinación asimbiótica por medio de cultivo *in vitro* fue reportada por primera vez en orquídeas por Knudson (1946; Arditti y Krikorian, 1996), se ocupa para aumentar y hacerla eficiente (Teixeira da Silva *et al.*, 2015). Es un método frecuente de propagación, sin embargo, el estado de latencia presente en muchas semillas de especies silvestres reduce significativamente su eficacia en condiciones naturales (Fay, 1994). Se han realizado diferentes investigaciones sobre la germinación y crecimiento temprano de plántulas, así como la determinación de los requerimientos óptimos nutricionales (Thomson *et al.*, 2006).

En ciertas orquídeas, las semillas germinan asépticamente y las plántulas se pueden desarrollar, incluso en ausencia de hormonas exógenas (Krikorian y Roca, 1991). Sin embargo, se han desarrollado diferentes protocolos *in vitro* para algunas especies, así como diversos medios, sales y reguladores de crecimiento vegetal, adecuados para la germinación y propagación (Arditti y Ernst, 1993).

Los reguladores de crecimiento son elementos importantes en la fase germinación como en *Vanda coerulea* (Devi *et al.*, 1998), o efectos inhibidores como lo encontrado en *Aerides rosea* (Shinha *et al.*, 1998). Según Deb y Temjensangba (2006) la germinación puede estar influenciada por el medio de cultivo, la adición de reguladores de crecimientos o la edad de las semillas.

La germinación asimbiótica es una técnica de propagación ocupada en la producción masiva y en la conservación de orquídeas (Arditti *et al.*, 1981; Kauth *et al.*, 2006; Stewart y Kane, 2006; Thomas y Michael, 2007).

En la germinación de orquídeas se debe considerar tres condiciones, la primera es la viabilidad, el embrión debe ser capaz de germinar; la segunda se refiere a las condiciones ambientales adecuadas y la tercera es la superación de la posible latencia (Pedroza-Manrique *et al.*, 2005). Otros factores que pueden romper este tipo de quiescencia son la alternancia de temperaturas, el lavado de inhibidores solubles al agua o la imbibición en soluciones de ácido giberélico (Iriando y Pérez, 1999).

### **2.7.3 Propagación clonal**

Para la propagación masiva de orquídeas a mayor escala, mediante las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, se pueden usar varias partes de la planta como explantes, por ejemplo, ápices de brote, segmentos de nudos de las inflorescencias, segmentos de hoja, tallo, brotes, protocormo, ápices meristemáticos y segmentos de rizoma (Morel, 1960; 1964; Capellades *et al.*, 1991; Batygina *et al.*, 2003; Vij y Aggarwal, 2003; Puchooa, 2004; Chugh *et al.*, 2009).

De todos estos explantes, la propagación a partir de yemas es de las más empleadas en especies de orquídeas, ya que se garantiza la estabilidad genética de las nuevas plantas y se evita la variación somaclonal (Condemarín-Montealegre *et al.*, 2007).

Los meristemas tienen la ventaja de ser tejidos genéticamente muy estables y de encontrarse normalmente libres de virus. No obstante, a menudo resulta difícil su utilización debido a que su manipulación es más compleja a consecuencia de su reducido tamaño (0.2-1.0 mm) y al largo período de tiempo requerido para el desarrollo de las plántulas. Debido a ello, es más frecuente la utilización de explantes caulinares constituidos por el meristemo apical y uno o más nudos (Iriando, 2001).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad - Genética del Colegio de Postgraduados - *Campus* Montecillo.

#### 3.1 Material vegetal

Se usaron cápsulas sanas y fisiológicamente en estado de madurez de *Bletia purpurea* var. *purpurea* obtenidas de una colección privada del municipio de Orizaba, del Estado de Veracruz.

#### 3.2 Medio de cultivo y condiciones de incubación

Durante las diferentes etapas de esta investigación se usó el medio de cultivo básico de Murashige y Skoog (MS; 1962) adicionado con sacarosa (20 - 30 g L<sup>-1</sup>), agar (Sigma® 9.5 g L<sup>-1</sup>), mioinositol (100 mg L<sup>-1</sup>) y tiamina (1.0 mg L<sup>-1</sup>). El pH se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl 1N, mediante un potenciómetro (Orion 3 star pH Benchtop Thermo Scientific®). La esterilización del medio de cultivo se hizo en una autoclave vertical (AESA®, modelo 300) a 121 °C y 1.5 kg cm<sup>-2</sup> de presión durante 20 min.

Los frascos de cultivo con el material vegetal sembrado en todos los experimentos, se incubaron en un cuarto bajo las siguientes condiciones ambientales: temperatura de 25 ± 2 °C, humedad relativa de 30 % y con fotoperiodo de 16/8 h luz/obscuridad, proporcionada por tubo T8 LED de policarbonato, luz fría blanca, con un flujo luminoso de 45 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

### 3.3 Establecimiento del cultivo aséptico

Las cápsulas sanas, sin daños mecánicos, cerradas y completamente desarrolladas, fueron cortadas y se envolvieron en toallas de papel absorbente para conservarlas en refrigeración durante un mes a 8 °C. Para la desinfección superficial se siguieron los pasos que se describen en la Figura 2.

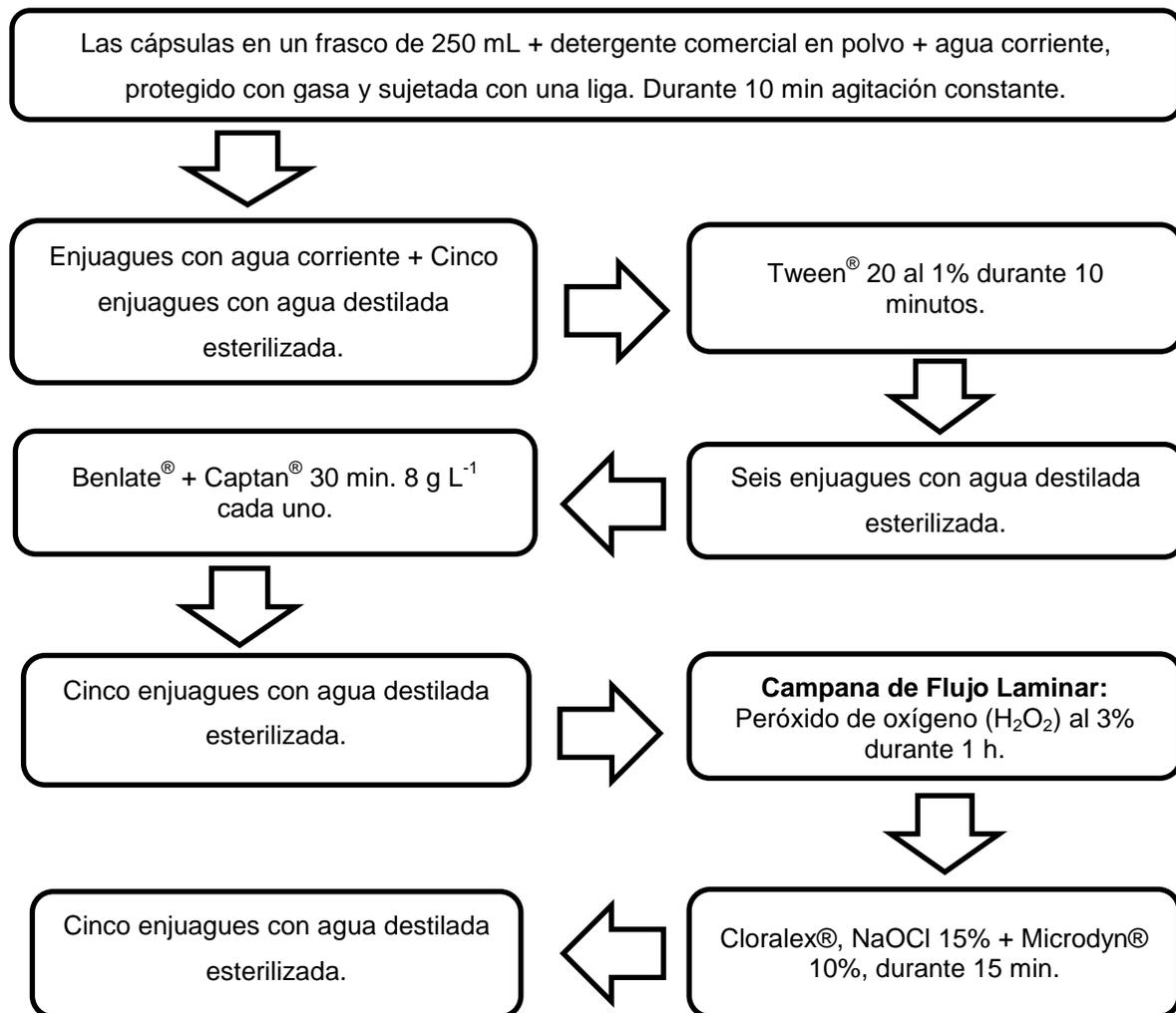


Figura 2. Pasos del tratamiento de desinfección superficial de cápsulas de *Bletia purpurea* var. *purpurea*.

### 3.3.1 Variables Cuantificadas

Después de cuatro semanas de cultivo se cuantificó la contaminación por bacterias y hongos (%).

## 3.4 Germinación de semillas y crecimiento de plántulas *in vitro*

### 3.4.1 Inducción de germinación

Para inducir la germinación se usó el medio de cultivo MS (1962), adicionado con sacarosa ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) y se evaluaron cuatro tratamientos integrados por las vitaminas del medio MS y las del medio Torrey y Reinert (TR, 1961) (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Suplementos orgánicos adicionados al medio de cultivo MS (1962) para evaluar la germinación de *Bletia purpurea* var. *purpurea*.**

Tratamiento (Núm.)	Vitaminas	Suplementos Orgánicos (%)
1	-	-
2	Vitaminas MS	50
3	Vitaminas TR	50
4	Vitaminas MS + Vitaminas TR	50 + 50

MS = Medio Murashige y Skoog (1962) y TR = Medio Torrey y Reinert (1961).

#### 3.4.1.1 Variables cuantificadas

A las cuatro semanas de cultivo se cuantificó la tasa de oscurecimiento del explante (%) y la respuesta morfogénica de las semillas medida como porcentaje de germinación (%) y el tiempo en que se presentó (días).

#### 3.4.1.2 Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con seis repeticiones por tratamiento. Se consideró como unidad experimental cada frasco con las semillas sembradas. Los datos se sometieron a un análisis de varianza usando el

programa estadístico SAS (SAS, 2002) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Se transformaron los datos usando la fórmula  $x = \sqrt{y + 1}$ .

### 3.4.2 Crecimiento de plántulas *in vitro*

Las plántulas obtenidas de los tratamientos de inducción de germinación, se subcultivaron para promover su alargamiento en el medio MS (1962) a la mitad de su concentración de sales, adicionado con sacarosa ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ), tiamina ( $1.0 \text{ mg L}^{-1}$ ); benciladenina (BA,  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido indolacético (AIA,  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) y carbón activado ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ).

### 3.5 Regeneración de plantas vía organogénesis directa

La capacidad morfogénica de *Bletia purpurea* var. *purpurea* se evaluó a partir de plántulas germinadas *in vitro*, se ocuparon explantes de toda la planta, excepto las raíces.

#### 3.5.1 Tipos de explante

Se seleccionaron plántulas germinadas *in vitro* de seis meses de edad con altura promedio de 15 cm y diámetro de pseudobulbo de 5 mm (Figura 3).

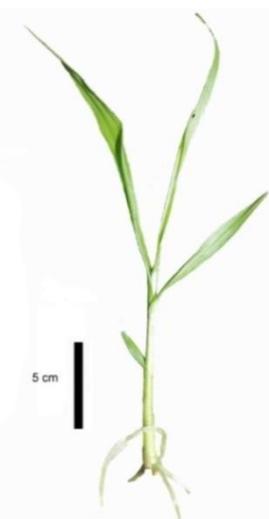
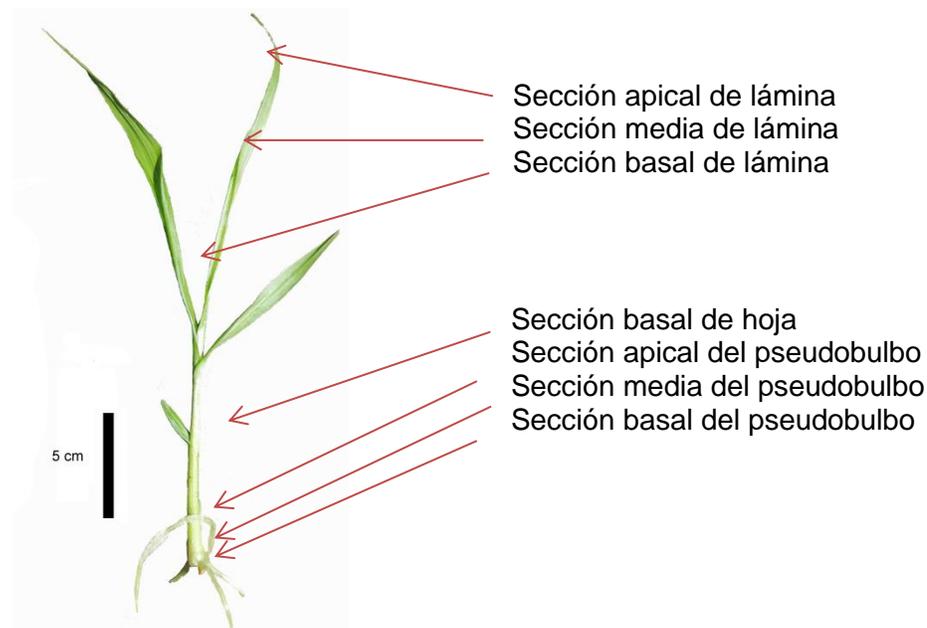


Figura 3. Morfología de una plántula de *Bletia purpurea* var. *purpurea* de seis meses de edad obtenida *in vitro*.

A las plántulas se les eliminaron las raíces antes de disecar los explantes. Se obtuvieron dos tipos tejidos como explantes: secciones de hoja y secciones del pseudobulbo. Los explantes de hoja consistieron en segmentos de la zona apical, media y basal de la lámina. Para los pseudobulbos se probó la técnica llamada Thin Cell Layer (TCL, Tran, 1973), la cual consiste en hacer cortes transversales para obtener capas delgadas (1-2 mm de grosor por 5 mm de diámetro) respetando su polaridad, para usarlos como explantes (Figura 4). Debido a esto, se obtuvieron secciones basales, media, apical y basal de la primera hoja. En total se obtuvieron siete explantes de cada plántula, los cuales se sembraron en el medio de cultivo MS (1962), adicionado con carbón activado (1 g L<sup>-1</sup>) y diferentes concentraciones de hormonas (Cuadro 2). Al combinar los 7 tipos de explantes con los 3 medios de cultivo evaluados se tuvo un experimento con 7 X 3= 21 tratamientos experimentales totales.



**Figura 4.** Plántula de *Bletia purpurea* var. *purpurea* obtenida *in vitro* donde se indican las zonas de disección para obtener los explantes.

**Cuadro 2.** Combinaciones de citocininas y auxinas y concentraciones del medio de cultivo evaluadas durante la etapa de inducción de brotes en diferentes explantes de *Bletia purpurea* var. *purpurea*.

Tratamiento (No)	Sacarosa (g L <sup>-1</sup> )	Medio de cultivo MS (%)	BA		ANA		AIA	
			mg L <sup>-1</sup>	µM	mg L <sup>-1</sup>	µM	mg L <sup>-1</sup>	µM
1	20	50	2.0	8.88	2.0	10.6	-	-

2	20	50	1.0	4.44	-	-	0.5	2.8
3	20	100	1.0	4.44	-	-	0.5	2.8

BA = Benciladenina; ANA = ácido naftalenacético, AIA = ácido indolacético.

### 3.5.1.1 Variables Cuantificadas

A las cuatro semanas de cultivo se registró el número de explantes con brotes y número de brotes por explante.

### 3.5.1.2 Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se condujo bajo un diseño completamente al azar con diez repeticiones por tratamiento. Se consideró como unidad experimental cada frasco con un explante plantado. Los datos se sometieron a un análisis de varianza usando el programa estadístico SAS (SAS, 2002) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

### 3.5.2 Inducción de brotes

Con el propósito de optimizar la producción de brotes y después de determinar el mejor tipo de explante, se estableció un nuevo experimento con 37 tratamientos experimentales para evaluar otras fuentes y dosis de reguladores del crecimiento, así como el porcentaje de sales del medio MS (1962), el cual siempre estuvo suplementado con carbón activado ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) (Cuadro 3). Se utilizaron secciones de discos de pseudobulbo de 5 mm de diámetro.

#### 3.5.2.1 Variables Cuantificadas

A las cuatro semanas de cultivo se cuantificaron el número de brotes por explante y porcentaje de brotación dado por el número de explante con respuesta.

### 3.5.2.2 Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se condujo en un diseño completamente al azar con diez repeticiones por tratamiento. Se consideró la unidad experimental una sección transversal de pseudobulbo plantada en cada frasco. Los datos se sometieron a un análisis de varianza usando el programa estadístico SAS (SAS, 2002) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

**Cuadro 3. Concentración de sales del medio de cultivo MS (1962), sacarosa, auxinas y citocininas evaluadas en la inducción de brotes de *Bletia purpurea* var. *purpurea* a partir de explantes de pseudobulbo al azar de la zona apical, media o basal.**

Tratamiento (No)	Citocinina		Auxina		Citocinina		Auxina		MS (%)	Sacarosa (g L <sup>-1</sup> )
	(mg L <sup>-1</sup> )	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)					
1	-	-	-	-	-	-	-	-	50	20
2	-	-	-	-	-	-	-	-	100	30
3	-	-	ANA	0.54	-	-	ANA	2.86	50	30
4	-	-	ANA	1.0	-	-	ANA	5.3	50	20
5	-	-	ANA	1.0	BA	-	ANA	5.3	50	30
6	-	-	ANA	2.0	-	-	ANA	10.6	50	20
7	-	-	AIA	0.5	-	-	AIA	2.85	50	30
8	-	-	AIA	0.93	BA	-	AIA	5.3	50	30
9	KIN	1.9	ANA	2.0	KIN	9.23	ANA	10.6	100	30
10	KIN	1.9	ANA	1.0	KIN	9.23	ANA	5.3	100	30
11	KIN	1.9	ANA	0.5	KIN	9.23	ANA	2.65	100	30
12	BA	1.0	-	-	BA	4.44	-	-	50	20
13	BA	1.0	ANA	1.0	BA	4.44	ANA	5.3	50	20
14	BA	1.0	ANA	2.0	BA	4.44	ANA	10.6	50	20
15	BA	1.0	AIA	0.5	BA	4.44	AIA	2.85	50	20
16	BA	1.0	AIA	0.5	BA	4.44	AIA	2.85	100	20
17	BA	1.0	-	-	BA	4.44	-	-	50	30
18	BA	1.0	ANA	1.0	BA	4.44	ANA	5.3	50	30
19	BA	1.0	AIA	0.93	BA	4.44	AIA	5.3	50	30
20	BA	1.0	AIA	0.93	BA	4.44	AIA	5.3	50	30
21	BA	1.0	ANA	0.54	BA	4.44	ANA	2.86	50	30
22	BA	1.0	AIA	0.5	BA	4.44	AIA	2.85	50	30
23	BA	2.0	-	-	BA	8.88	-	-	50	20
24	BA	2.0	ANA	1.0	BA	8.88	ANA	5.3	50	20
25	BA	2.0	ANA	2.0	BA	8.88	ANA	10.6	50	20
26	BA	2.0	ANA	2.0	BA	8.88	ANA	10.6	100	30
27	BA	2.0	ANA	1.0	BA	8.88	ANA	5.3	100	30
28	BA	2.0	ANA	0.5	BA	8.88	ANA	2.65	100	30

29	BA	2.0	-	-	BA	8.88	-	-	50	30
30	BA	2.0	ANA	1.0	BA	8.88	ANA	5.3	50	30
31	BA	2.0	ANA	0.54	BA	8.88	ANA	2.86	50	30
32	BA	2.0	AIA	0.5	BA	8.88	AIA	2.85	50	30
33	BA	3.0	-	-	BA	13.32	-	-	50	30
34	BA	3.0	ANA	1.0	BA	13.32	ANA	5.3	50	30
35	BA	3.0	AIA	0.93	BA	13.32	AIA	5.3	50	30
36	BA	3.0	ANA	0.54	BA	13.32	ANA	2.86	50	30
37	BA	3.0	AIA	0.5	BA	13.32	AIA	2.85	50	30

AIA = ácido indol-3-acético, ANA = ácido naftalenacético, BA = Benciladenina, KIN = 6-furfurilaminopurina.

### 3.5.3 Multiplicación de brotes

En esta etapa del proceso se utilizaron brotes de 0.5-1.0 cm y se subcultivaron en frascos de vidrio de 100 mL de capacidad, con 30 mL de medio de cultivo MS (1962) adicionado con sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>), carbón activado (1 g L<sup>-1</sup>) y se probaron diferentes concentraciones sales del medio, auxinas y citocininas (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Medio de cultivo MS (1962) adicionado con sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>), auxinas y citocininas evaluadas en la multiplicación de brotes de *Bletia purpurea* var. *purpurea* a partir de explantes de pseudobulbo.**

Tratamiento (No)	Citocinina mg L <sup>1</sup>		Auxina mg L <sup>1</sup>		Citocinina μM		Auxina μM	
1	-	-	ANA	1.0	-	-	ANA	5.3
2	-	-	AIA	0.93	-	-	AIA	5.3
3	-	-	ANA	0.54	-	-	ANA	2.86
4	-	-	AIA	0.5	-	-	AIA	2.85
5	BA	1.0	-	-	BA	4.44	-	-
6	BA	1.0	ANA	1.0	BA	4.44	ANA	5.3
7	BA	1.0	AIA	0.93	BA	4.44	AIA	5.3
8	BA	1.0	ANA	0.54	BA	4.44	ANA	2.86
9	BA	1.0	AIA	0.5	BA	4.44	AIA	2.85
10	BA	2.0	-	-	BA	8.88	-	-
11	BA	2.0	ANA	1.0	BA	8.88	ANA	5.3
12	BA	2.0	ANA	0.54	BA	8.88	ANA	2.86
13	BA	2.0	AIA	0.5	BA	8.88	AIA	2.85
14	BA	3.0	-	-	BA	13.32	-	-
15	BA	3.0	ANA	1.0	BA	13.32	ANA	5.3
16	BA	3.0	AIA	0.93	BA	13.32	AIA	5.3
17	BA	3.0	ANA	0.54	BA	13.32	ANA	2.86
18	BA	3.0	AIA	0.5	BA	13.32	AIA	2.85

AIA = ácido indol-3-acético, ANA = ácido naftalenacético, BA = Benciladenina, KIN = 6-furfurilaminopurina.

### **3.5.3.1 Variables cuantificadas**

A las tres semanas de cultivo se cuantificó el número brotes por explante y porcentaje de brotación.

### **3.5.3.2 Diseño experimental y análisis estadístico**

El experimento se condujo en un diseño completamente al azar con diez repeticiones por tratamiento. Se consideró la unidad experimental cada frasco sembrado con un brote de 0.5 - 1.0cm en el frasco. Los datos se sometieron a un análisis de varianza usando el programa estadístico SAS (SAS, 2002) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

### **3.5.4 Enraizamiento *in vitro* de plántulas**

Se seleccionaron plántulas de 10 cm de altura y se cultivaron en frascos de 250 mL de capacidad, con 40 mL de medio de cultivo. Se usó el medio de cultivo MS (1962) a la mitad de concentración de sales, adicionado con sacarosa ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) y dos concentraciones de AIB (2 y  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$ ).

#### **3.5.4.1 Variables cuantificadas**

A los 15, 20 y 25 días se midió número y tamaño de raíces (cm) y el porcentaje de enraizamiento.

#### **3.5.4.2 Diseño experimental y análisis estadístico**

El experimento se condujo en un diseño completamente al azar con diez repeticiones por tratamiento. Se consideró la unidad experimental una plántula plantada en cada frasco. Los datos de número y tamaño de raíces, se sometieron a un análisis de varianza usando el programa estadístico SAS (SAS, 2002) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

### 3.5.5 Aclimatación

En esta etapa se seleccionaron plántulas de 12 cm de altura, se enjuagaron con agua destilada estéril y se trasplantaron individualmente en vasos de unicel de 118 mL con una mezcla de agrolita- peat moss (1:1) previamente humedecido, se protegieron con una bolsa de polietileno transparente sujeta con una liga.

A los 15, 20 y 25 días se hicieron dos perforaciones en los extremos de las bolsas de plástico y al término de 30 días después del trasplante se retiró la protección. Dos semanas después se evaluó el porcentaje de supervivencia. El proceso empleado para evaluar la regeneración *in vitro* de *Bletia purpurea* var. *purpurea* vía organogénesis directa se detalla en la figura 4.

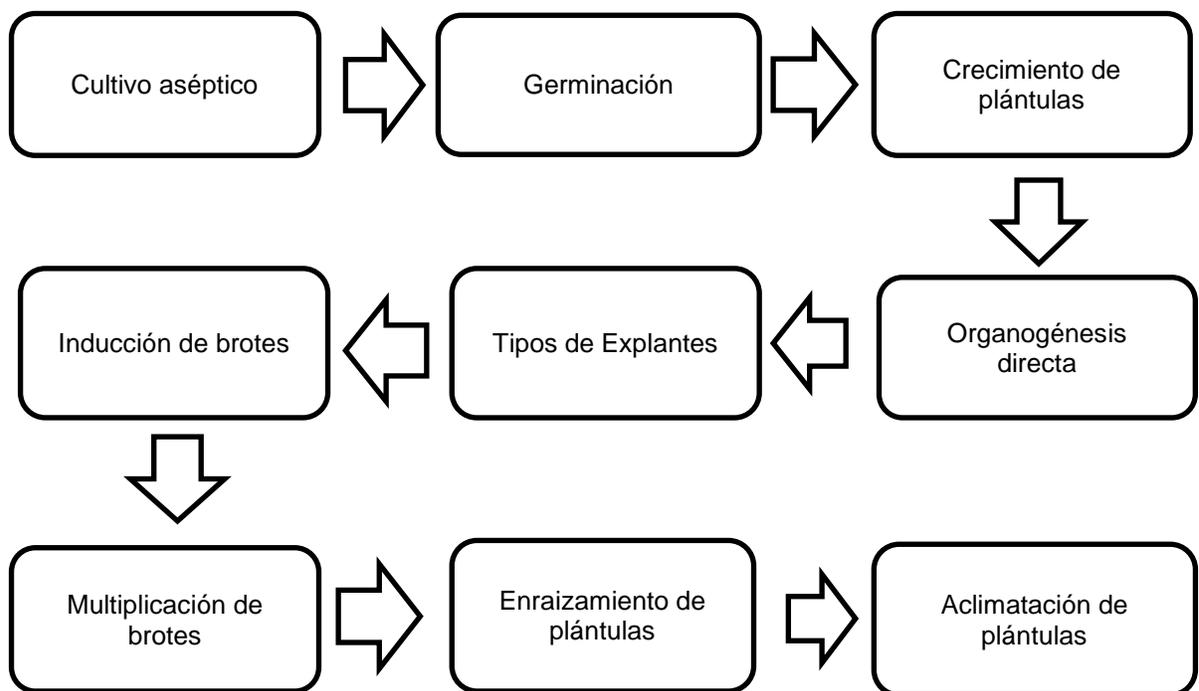


Figura 5. Etapas del proceso metodológico para la regeneración *in vitro* de *Bletia purpurea* var. *purpurea* vía organogénesis directa.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Establecimiento del cultivo aséptico

El procedimiento que se empleó para la limpieza de las cápsulas de *Bletia purpurea* var. *purpurea* (inmersión de las cápsulas en una solución de Tween<sup>®</sup> 20 al 1% durante 10 min, seguido de seis enjuagues con agua destilada esterilizada (ADE), posteriormente su inmersión en una solución de Benlate<sup>®</sup> + Captan<sup>®</sup> (8 g L<sup>-1</sup> cada uno) durante 30 min, después en peróxido de oxígeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3% durante 1 h y por último en una solución de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex<sup>®</sup>, NaOCl) 15% + Microdyn<sup>®</sup> 10% durante 15 min), resultó un método eficiente, ya que después de cuatro semanas de haberlo aplicado el porcentaje de contaminación registrado fue bajo (4%) y se debió a la presencia de bacterias (Figura 6b), lo cual podría atribuirse a un manejo inadecuado de las semillas al momento de la siembra.

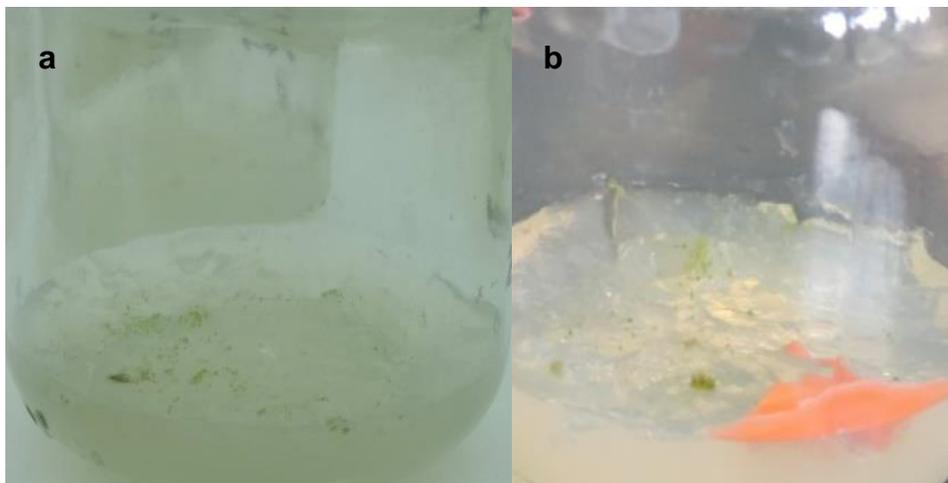


Figura 6. Semillas en la fase del establecimiento del cultivo aséptico de *Bletia purpurea* var. *purpurea*. a) sin contaminación b) contaminación por bacteria

La utilización de cápsulas cerradas facilitó y mejoró el proceso de limpieza y desinfección, ya que en otros estudios previamente reportados en la misma especie *Bletia purpurea*, los procedimientos usados fueron más complejos, con mayor número de manipulaciones de las cápsulas y presentaron mayores tasas de contaminación. En estos reportes, las cápsulas fueron inicialmente deshidratadas colocándolas sobre gel de sílice durante dos semanas, después extrajeron las semillas y las mantuvieron en oscuridad y frío (-10 °C) sobre el mismo gel antes de someterlas al proceso de

desinfección (Dutra *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2011). Como en el caso de *Cyrtopodium punctatum* que sumergieron las semillas en una solución de: etanol 100 % + NaOCl al 6 % + agua destilada, desionizada y estéril (ADDE) y por último enjuagaron con ADDE (Dutra *et al.*, 2009).

La cápsula sirve como protector natural contra agentes contaminantes, permite que el manejo y el procedimiento desinfección de semillas puedan ser más agresivos sin causar daños a las mismas. Como el uso de fuego para complementar este proceso ejemplos de ello son *Dendrobium nobile* “híbridos” (Udomdee *et al.*, 2014), *Coelogyne nervosa* (Abraham *et al.*, 2012), *Cymbidium faberi* (Chen *et al.*, 2005) y *Dendrobium nobile* (Bhattacharyya *et al.*, 2014). Además la cápsula brinda una barrera física entre las semillas y las sustancias utilizadas durante esta fase, evitando así un posible efecto nocivo (Buyun *et al.*, 2004).

El método de desinfección desarrollado en la presente investigación es sencillo comparado con otros. En algunos casos se han desarrollado métodos de desinfección complejos que también han funcionado. Así, en la orquídea *Eulophia nuda* el proceso de desinfección incluyó la inmersión en solución de NaOCl (2%) + Tween 20<sup>®</sup>, durante 15-20 min y con enjuagues de agua destilada, después se sumergieron en solución de Bavistin<sup>®</sup> (Fungicida)+ Estreptomina<sup>®</sup> durante 15 – 17 min seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril seguido de etanol 70% durante 60 s, por último en la campana de flujo laminar sumergió en una solución de HgCl<sub>2</sub> durante 5 – 7 min + enjuagues de agua destilada estéril (Panwar *et al.*, 2012; Nanekar *et al.*, 2014)

Los tratamientos con fungicidas como el Benomil ayudan a reducir la contaminación por hongos (Smith, 2013). Además el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un poderoso oxidante por lo que sirve como un estimulador de la germinación (Fenner, 2000) y es una de las sustancia reactivas del oxígeno que se producen de forma natural en la invasión de un patógeno durante la respuesta hipersensible matando microbios (Taiz y Zeiger, 2010). La adición de Tween<sup>®</sup> 20 como agente surfactante, combinado con NaOCl resultan eficientes en el

establecimiento de un cultivo aséptico cuando se determinan las concentraciones y tiempos de inmersión óptimos (Smith, 2013).

En la desinfección de orquídeas de diferentes especies, incluidas *Cymbidium faberi*, *Dactylorhiza incarnata* subsp. *serotina*, *Dactylorhiza maculata* subsp. *maculata*, *Dendrobium nobile* var. 'Emma White', *Dendrobium officinale*, *Doritaenopsis* sp., *Esmeralda clarkei*, *Liparis loeselii*, *Laelia albida*, *Laelia speciosa*, *Nothodoritis zhejiangensis*, *Paphiopedilum* spp., *Phalaenopsis* sp., *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*, *Phalaenopsis gigantea*, *Vanda tessellata*, entre otras, es posible emplear diferentes agentes desinfectantes que brindan resultados óptimos. Estos agentes pueden incluir detergentes comerciales, NaOCl, etanol (70-75%), cloruro de calcio [Ca (ClO)<sub>2</sub>], Tween<sup>®</sup>20, e incluso cloruro de mercurio. Estos productos son más efectivos cuando se disuelven en agua destilada o desionizada esterilizada (Tokuhara y Mii, 1993; Park *et al.*, 2000; Santos-Hernández *et al.*, 2005; Vejsadová, 2006; Ávila-Díaz *et al.*, 2009; Asghar *et al.*, 2011; Chutima *et al.*, 2011; Niknejad *et al.*, 2011; Paudel y Pant, 2012; Tao *et al.*, 2011; Zeng *et al.*, 2011; Feng y Chen, 2014; Tan *et al.*, 2014; Bhattacharjee *et al.*, 2015).

En otras especies se han reportado métodos de desinfección que resultaron sencillos para el establecimiento del cultivo aséptico. Por ejemplo, en cápsulas de *Calanthe sieboldii* se utilizó una solución de NaOCl (2.0%) durante 20 minutos, seguido de enjuagues con agua destilada estéril, en *Zygostates grandiflora* con NaOCl (4.0%) durante 30 minutos seguido de enjuagues con agua destilada estéril (Pacek-Bieniek *et al.*, 2010), o en *Cypripedium macranthos* se utilizó una solución de NaOCl (2.5%) durante diez minutos, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril (Zhang *et al.*, 2013). En el caso de *Malaxis khasiana*, Deb y Temjensangba (2006) lograron la desinfección de las cápsulas de esta orquídea solo con la inmersión en una solución acuosa de HgCl<sub>2</sub> (0.05% w/v) durante cinco min, seguido de cinco enjuagues con agua esterilizada.

Los tratamientos de desinfección empleados para establecer los cultivos asépticos responden a la naturaleza y condiciones de la especie, al tipo de explante, a las

condiciones fitosanitarias de la planta madre, entre otros factores. Una planta que es un ejemplar de vida silvestre siempre está en contacto con diferentes factores contaminantes que pueden significar una barrera para el establecimiento del cultivo aséptico. En cambio, de una planta madre mantenida en condiciones de invernadero los explantes pueden estar en un estado fitosanitario más limpio. La obtención de material proveniente de semillas desinfectadas, es considerado como una alternativa para la propagación y preservación de las especies, debido a que simulan las condiciones naturales (Teixeira da Silva *et al.*, 2015).

#### 4.2 Germinación *in vitro* de semillas

Los cuatro tratamientos de medios de cultivo evaluados tuvieron un efecto significativo sobre la tasa de germinación de las semillas, pero no sobre el tiempo en que ésta se presentó ni el oscurecimiento de las semillas (Apéndice 2). La mejor respuesta a las cuatro semanas de cultivo se obtuvo con en el medio MS (1962) basal sin vitaminas, adicionado con sacarosa ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) donde la germinación fue de 100% (Figura 7), estos resultados concuerdan con Dutra *et al.* (2008), quienes evaluaron los medios Knudson C (KC, 1946), P723 (Johnson *et al.*, 2007), MM (1996), VW (1949), MS (1962) y BM-1 (1986) en *Bletia purpurea*, donde al término de cinco semanas de cultivo los porcentajes de germinación fueron de 93 a 100% y la respuesta no fue afectada significativamente por el medio de cultivo.

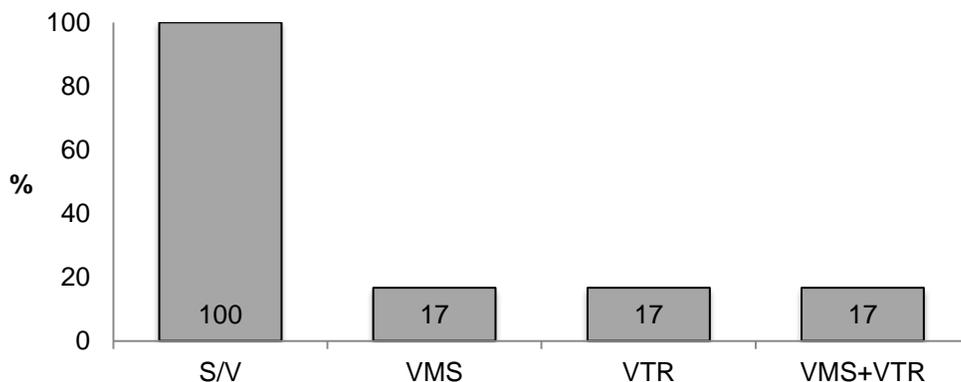


Figura 7. Germinación de *Bletia purpurea* var. *purpurea* después de cuatro semanas de cultivo. S/V= Sin Vitaminas; MS= Murashige y Skoog (1962); V=Vitaminas; TR= Torrey y Reinert (1961).

En esta investigación se confirmó que el uso del medio MS es idóneo para la fase de germinación de *Bletia purpurea* var. *purpurea*, además se puede lograr sin adición de vitaminas u otros compuestos. Estos porcentajes concuerdan con los obtenidos por Santos y Carranza (2009) en la orquídea *Encyclia mariae* a los 30 días sobre un medio basal MS (1962) y en el mismo medio y tiempo para *Vanda tessellata* (Bhattacharjee *et al.*, 2015). Es importante resaltar que no hay reportes sobre la germinación de *Bletia purpurea* var. *purpurea*, ni para ninguna especie del género en México.

La respuesta de germinación de las semillas en todos los tratamientos evaluados se presentó a los 33 días de la siembra (Figura 8). Este lapso se considera menor en comparación con la respuesta en la orquídea *Coelogyne nervosa*, donde la germinación se presentó después de 67 días en el medio basal MS (1962) (Abraham *et al.*, 2012). En cambio, el tiempo fue mayor comparado con *Vanda coerulea*, donde la germinación ocurrió a los 22 días en el mismo medio de cultivo (Roy *et al.*, 2011).



**Figura 8. Germinación de semillas de *Bletia purpurea* var. *purpurea* en medio de cultivo MS (1962) después de cuatro semanas de cultivo.**

Aunque la composición química del medio de cultivo MS (1962) es uno de los más empleados por favorecer la germinación de semillas de orquídeas (Mahendran y Narmatha, 2009; Bhattacharjee *et al.*, 2015; Teixeira da Silva *et al.*, 2015), no siempre se alcanzan los mejores resultados. En la orquídea *Odontoglossum gloriosum* el medio MS solo promovió el 2.57% de germinación en un periodo de 126 días (Pedroza-Manrique y Mican-Gutiérrez, 2006); en *Cypripedium macranthos* solo se obtuvo 9.5%

de germinación con el medio MS modificado (Zhang *et al.*, 2013) y en *Cyrtopodium punctatum* el porcentaje de germinación sólo fue de 12.9% en el medio MS (1962) a la mitad de concentración de sales (Dutra *et al.*, 2009). En las orquídeas *Nothodoritis zhejiangensi* y *Pterostylis sanguinea* los porcentajes de germinación también fueron bajos (15.7 y 40-53.3%, respectivamente) en el medio MS (1962) a la mitad de sales (Zeng *et al.*, 2011; Nikabadi *et al.*, 2014).

Por estas respuestas desfavorables en algunas especies se ha optado por el uso de otros medios de cultivo. En *Vanda tessellata* Bhattacharjee *et al.* (2015) ocuparon el medio B5 (Gamborg *et al.*, 1968) donde se obtuvieron porcentajes de germinación de 45% en un periodo de 45-50 días. Zeng *et al.* (2011) reportaron la mejor respuesta de germinación (64.7%) en la orquídea *Nothodoritis zhejiangensi* cuando se usó el medio KC (1946) adicionado con 0.53  $\mu\text{M}$  (0.1  $\text{mg L}^{-1}$ ) de ANA+ agua de coco 10% y carbón activado 0.1%. En la orquídea *Calenthe tricarinata* Godo *et al.* (2010) reportaron 18% de germinación en el medio basal New Dogoshima (Tokuhara y Mii, 1993).

Por su parte, Johnson *et al.* (2007) reportaron un elevado porcentaje de germinación (87.9%) en *Eulophia* en el medio P723 hasta después de 18 semanas. Si bien estos porcentajes de germinación son bajos en comparación con lo obtenido en la presente investigación, la respuesta puede estar influenciada no necesariamente por el medio de cultivo sino también por la especie de orquídea, la viabilidad de las semillas y por el grado de madurez de la semilla al momento de cosechar las cápsulas.

En otras orquídeas se ha reportado la necesidad de adicionar reguladores de crecimiento u otros compuestos para lograr la germinación de semillas. En *Rhynchosstylis retusa* se obtuvo 93% de germinación cuando se adicionó al medio MS (1962) agua de coco (15%) (Thomas y Michael, 2007), en *Zygostates grandiflora* adicionaron al medio MS, 8.88  $\mu\text{M}$  de BAP + 8.55  $\mu\text{M}$  de AIA (Pacek-Bieniek *et al.*, 2010), En la orquídea *Orchis coriophora*, Bektaş *et al.* (2013) obtuvieron el mayor porcentaje de germinación (44.2%) en el medio Orchimax®, adicionado con 5.7  $\mu\text{M}$  de ácido indol-3-acético (AIA).

Aunque el uso de extractos, jugos o hidrolizados como el agua de coco, homogenizado de papa, plátano, tomate etc., es común para sustituir vitaminas o aminoácidos definidos, la repetitividad en la preparación del medio sugiere evitar el uso de los mismos porque pueden variar en su composición (George *et al.*, 2008).

Respecto al tiempo que transcurre para que ocurra la germinación, éste puede ser variable y puede estar relacionado con el medio de cultivo empleado, el proceso y las sustancias empleadas durante la limpieza y desinfección, la especie, el vigor y el grado de madurez de las semillas. Stewart y Kane (2006) encontraron que la mejor tasa de germinación en *Habenaria macroceratitis* se presentó hasta los 63 días en diferentes medios de cultivo.

Además, Deb y Temjensangba (2006) reportaron que el mayor porcentaje de germinación (75%) en *Malaxis khasiana* se obtuvo a los 107 días en el medio de cultivo MS (1962) adicionado con sacarosa (20%), caseína hidrolizada (500 mg L<sup>-1</sup>) y 1 µM de BA. Resultados similares se obtuvieron en *Cleisostoma recemiferu* (Temjensangba y Deb, 2006) y *Rhynchosyilis retusa* donde el 93% de germinación ocurrió en el medio MS (1962) adicionando con 15% de agua de coco (Thomas y Michael, 2007) o en el medio basal como *Laelia speciosa* con un 60% (Ávila-Díaz *et al.*, 2009).

Los otros tratamientos probados con la adición al medio de las vitaminas TR (Torrey y Reinert, 1961) o en combinación con las del MS (Murashige y Skoog, 1962), dieron porcentajes bajos, esto puede ser atribuido a que influyen en el balance y disponibilidad de iones del medio, además la adición de vitaminas probablemente no es esencial en la germinación, como si lo es en otros procesos morfogénicos, esto depende del tejido, órgano o planta (George *et al.*, 2008).

## 4.3 Regeneración de plantas vía organogénesis directa

### 4.3.1 Tipos de explante

Para evaluar la capacidad morfogénica de diferentes explantes disecados de plántulas germinadas *in vitro* se probaron tres tratamientos de medios de cultivo. Los resultados obtenidos señalan que de los siete tipos de explantes evaluados solo algunos mostraron capacidad para la morfogénesis *in vitro*. Los explantes provenientes de pseudobulbo, independiente de la zona de donde fueron disectados (basal, media o apical) fueron los que presentaron la mejor respuesta organogénica. La posición del explante no mostró diferencias significativas en la respuesta a los tratamientos hormonales ( $P \leq 0.05$ , Cuadro 5).

Los segmentos de hojas son utilizados como explantes por lo fácil de obtenerlos y porque el daño en la planta donante es menor. La edad de este tipo de explante influye en la respuesta morfogénica, es así que las hojas jóvenes a diferencia de las maduras aseguran el éxito de la micropropagación en algunas especies (Chugh *et al.*, 2009). Los explantes de hoja de *Bletia purpurea* var. *purpurea*, sin importar la zona de disección, rápidamente se necrosaron, ya que adquirieron una coloración café que inició desde los bordes hasta cubrir los tejidos completamente después de 20 días del establecimiento *in vitro* (Figura 9a). En estos explantes las respuestas morfogénicas se consideraron nulas debido a que no se observó la formación de callos, ni de brotes adventicios.

Como se señaló previamente, los explantes que sí mostraron capacidad morfogénica para la micropropagación fueron los segmentos disecados de pseudobulbos (Figura 9b). La respuesta obtenida en estos explantes se debió a la presencia de zonas de crecimiento o meristemas en condición quiescente, los cuales se activaron y respondieron a la presencia de los reguladores del crecimiento suplementados al medio de cultivo, mismos que provocan la reducción de la zona citoplasmática, la diferenciación de las células del parénquima y retardando la formación de hojas (Chugh *et al.*, 2009). Además, el ácido naftalenacético exógeno, es el principal diferenciador de

rizomas, ramas y en combinación de citocininas la producción de brotes. Para algunas orquídeas terrestres los segmentos de pseudobulbos resultan los explantes indicados para establecer sistemas de propagación eficientes (Chugh *et al.*, 2009).

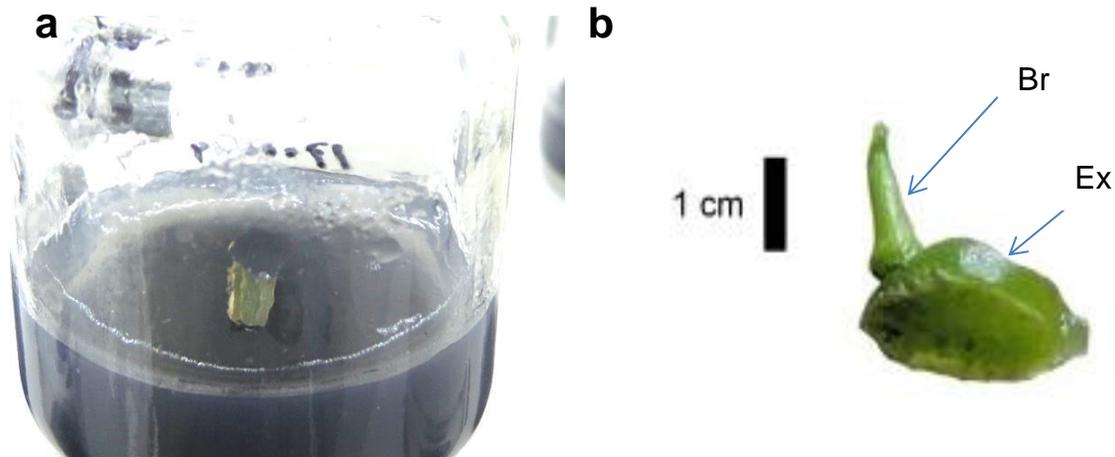


Figura 9. Respuesta de explantes de *Bletia purpurea* var. *purpurea* sobre el medio MS (1962) evaluando el tipo de explante, adicionando al medio dos concentraciones de BA (4.44 – 8.88  $\mu\text{M}$ ) en combinación con ANA (10.  $\mu\text{M}$ ) y AIA (2.8  $\mu\text{M}$ ), después de 4 semanas de cultivo. a) Oscurecimiento de explante (hoja) sin respuesta y b) Explante de pseudobulbo con respuesta. Br = brote, Ex = explante.

Cuadro 5. Respuesta organogénica de explantes de pseudobulbo de *Bletia purpurea* var. *purpurea* sobre el medio MS a las cuatro semanas de cultivo.

Concentración de sales (%)	BA	ANA	AIA	Explante	Número de brotes por explante	Brotación (%)
	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$			
50	8.88	10.6	-	Sección basal	0.6	60
50	8.88	10.6	-	Sección media	0.9	90
50	8.88	10.6	.	Sección apical	1.0	100
50	4.44	-	2.8	Sección basal	0.7	70
50	4.44	-	2.8	Sección media	0.8	80
50	4.44	-	2.8	Sección apical	0.9	90
100	4.44	-	2.8	Sección basal	0.9	90
100	4.44	-	2.8	Sección media	0.7	70
100	4.44	-	2.8	Sección apical	1.0	100

BA = Benciladenina; ANA = ácido naftalenacético, AIA = ácido indolacético.

Con las técnicas de cultivo *in vitro* usando meristemas se pueden obtener plantas libres de bacterias, hongos, virus y permiten la obtención de plantas idénticas a la planta madre. En orquídeas de crecimiento simpodial estos explantes son los recomendables por ejemplo para *Dendrobium*, *Cymbidium*, *Arundina*, *Phaius* y *Anoectochilus* (Chugh *et al.*, 2009). La micropropagación a través de la regeneración directa de brotes, depende de la especie y las condiciones del medio (Zeng *et al.*, 2013), es por ello que se deben probar diferentes concentraciones hormonales para encontrar los niveles óptimos, los mejores compuestos químicos y las combinaciones que produzcan las mayores respuestas. En este sentido, los resultados de este experimento indican que la presencia de BA en combinación con cualquiera de las dos auxinas evaluadas: ANA o AIA fueron capaces de romper la latencia de las yemas axilares y activarlas para inducir la producción de nuevos brotes (Cuadro 5). Sin embargo, los brotes producidos estuvieron limitados por el número de yemas existentes en cada explante, por lo que los promedios calculados resultaron relativamente bajos.

#### **4.3.2 Inducción de brotes**

Después de definir a los segmentos de pseudobulbo como el mejor tipo de explante, se evaluaron otras fuentes y dosis hormonales, así como el porcentaje de sales del medio MS (1962), adicionado con carbón activado ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) para optimizar la organogénesis. Los tratamientos evaluados tuvieron efecto significativo sobre el número de brotes por explante y el porcentaje de brotación ( $P \leq 0.05$ ) (Apéndice 4).

La respuesta considerada como positiva, fue la generación de brotes, mismos que se observaron a los siete días después de la siembra (Figura 10). La brotación fue variable y los porcentajes fluctuaron desde 20 a 100% (Cuadro 6). Todos los tratamientos evaluados fueron capaces de producir brotes, sin embargo, los mejores tratamientos incluyeron el medio MS (1962) al 50 % de sales, adicionado con  $20 \text{ g L}^{-1}$  y carbón activado ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ). Las citocininas y auxinas son las fitohormonas que regulan la morfogénesis *in vitro*, ya que solas o combinadas pueden inducir la organogénesis y embriogénesis somática, ya sea de manera directa o indirecta. Su balance es crucial

para la inducción de brotes y el crecimiento de los mismos (De Pauw *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2005; Long *et al.*, 2010).



**Figura 10.** Brote adventicio de *Bletia purpurea* var. *purpurea* en explantes de pseudobulbo a los 7 días de cultivo en medio MS (1962) adicionado con 8.88  $\mu\text{M}$  de BA + 5.3  $\mu\text{M}$  de ANA. Br = brote.

De todas las concentraciones hormonales probadas once destacaron por promover 100% de brotación (Cuadro 6). Estos porcentajes son parecidos con los reportados para *Eulophia nuda*, donde 95% de la brotación se obtuvo en el medio MS (1962), sin embargo la cantidad fue 44.4  $\mu\text{M}$  de BA (Panwar *et al.*, 2012), concentración mucho mayor a lo probado en esta investigación. En *Cymbidium* “Sleeping Nymph” hubo un 83 % de brotación a los 30 dds pero el medio basal fue Knudson C (1946), y tuvo un tratamiento previo con agua de coco (Vyas *et al.* (2010).

**Cuadro 6.** Respuesta del explantes de pseudobulbo de *Bletia purpurea* var. *purpurea* en la fase de inducción de brotación.

MS (%)	Sacarosa (g L <sup>-1</sup> )	Citocinina ( $\mu\text{M}$ )		Auxina ( $\mu\text{M}$ )		Brotes por explante <sup>II</sup>	Brotación %
50	20	-	-	-	-	1.20 ab	100a
100	30	-	-	-	-	1.00 ab	60 ab
50	30	-	-	ANA	2.86	0.70 ab	40 ab
50	20	-	-	ANA	5.3	1.10 ab	100 a
50	30	-	-	ANA	5.3	0.50 ab	40 ab

50	20	-	-	ANA	10.6	1.20 ab	100 a
50	30	-	-	AIA	2.85	0.40 ab	40 ab
50	30	-	-	AIA	5.3	0.60 ab	40 ab
100	30	KIN	9.23	ANA	10.6	0.75 ab	50 ab
100	30	KIN	9.23	ANA	5.3	0.62 ab	30 ab
100	30	KIN	9.23	ANA	2.65	0.75 ab	40 ab
50	20	BA	4.44	-	-	1.20 ab	100 a
50	20	BA	4.44	ANA	5.3	1.40 a	100 a
50	20	BA	4.44	ANA	10.6	1.20 ab	100 a
50	20	BA	4.44	AIA	2.85	1.10 ab	100 a
100	20	BA	4.44	AIA	2.85	1.20 ab	100 a
50	30	BA	4.44	-	-	0.50 ab	50 ab
50	30	BA	4.44	ANA	5.3	0.90 ab	70 ab
50	30	BA	4.44	AIA	5.3	0.40 ab	30 ab
50	30	BA	4.44	AIA	5.3	0.60 ab	50 ab
50	30	BA	4.44	ANA	2.86	0.70 ab	60 ab
50	30	BA	4.44	AIA	2.85	1.10 ab	90 ab
50	20	BA	8.88	-	-	1.20 ab	100 a
50	20	BA	8.88	ANA	5.3	1.40 a	100 a
50	20	BA	8.88	ANA	10.6	1.40 a	100 a
100	30	BA	8.88	ANA	10.6	0.87 ab	50 ab
100	30	BA	8.88	ANA	5.3	0.62 ab	30 ab
100	30	BA	8.88	ANA	2.65	0.87 ab	60 ab
50	30	BA	8.88	-	-	0.50 ab	50 ab
50	30	BA	8.88	ANA	5.3	1.10 ab	70 ab
50	30	BA	8.88	ANA	2.86	0.70 ab	60 ab
50	30	BA	8.88	AIA	2.85	0.60 ab	50 ab
50	30	BA	13.32	-	-	0.70 ab	60 ab
50	30	BA	13.32	ANA	5.3	0.20 b	20 b
50	30	BA	13.32	AIA	5.3	0.40 ab	40 ab
50	30	BA	13.32	ANA	2.86	0.50 ab	50 ab
50	30	BA	13.32	AIA	2.85	0.90 ab	70 ab

¶Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ), Brotación=Porcentaje de explantes con respuesta.

En el presente estudio con *Bletia purpurea* var. *purpurea* el medio basal MS (1962) a la mitad de concentración de sales, adicionado con 20 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 1g L<sup>-1</sup> de carbón activado, favoreció el 100% de brotación. Esta respuesta podría ser atribuida a las hormonas endógenas, que son la responsables de la génesis de diferentes tejidos, cuya síntesis no es promovida por factores externos pero responden cuando se aíslan células o tejidos (Tran, 1981).

La mayor cantidad de brotes que se obtuvieron por explante fue de 1.4 brotes a los 7 dds en el medio MS (1962) a la mitad de concentración de sales, adicionado con 20 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 1 g L<sup>-1</sup> de carbón activado. Las condiciones del medio de cultivo como de especie son factores que influyen en la respuesta organogénica del explante, es así que el uso de carbón activado mantiene los niveles de pH estable y eleva la absorción de nitrógeno (Eymar *et al.*, 2000). De acuerdo con Batygina *et al.* (2003) las orquídeas con pseudobulbo regeneran un brote debido a la naturaleza del explante. González y Cueva (2014) para *Cyrtochilum loxens* la mejor respuesta (0.57 brotes), se obtuvo en combinación de 2.22 µM BA y 5.3 µM ANA después de 60 días de cultivo.

Para la fase de inducción de brotes las mejores concentraciones fueron las combinaciones de BA + ANA (8.88 + 5.3, 4.44 + 5.3, 8.88+ 10.6, µM respectivamente) (Cuadro 6). Para *Paphiopedilum hangianum*, Zeng *et al.* (2013) reportaron las mismas tres combinaciones de BA + ANA entre los mejores tratamientos hormonales, donde los explantes produjeron 3.4, 3.23 y 3.27 brotes por explantes respectivamente, en medio MS a la mitad de concentración de sales adicionado con 10% de agua de coco, 2 g L<sup>-1</sup> de peptona y 170 mg L<sup>-1</sup> de bifosfato de sodio. En *Paphiopedilum armeniacum* 8.88 µM de BA + 5.3 µM de ANA Long *et al.* (2010), obtuvieron 1.17 brotes por nudo. Para *Dendrobium* 'Sonia' 4.44 µM de BA + 5.3 µM de ANA promovieron la mejor respuesta organogénica originando 37 cuerpos parecidos a protocormos (Puchooa, 2004), o en *Cymbidium faberi* la misma concentración formó 2.8 brotes por explante (Chen *et al.*, 2005).

Además para *P. villosum* var. *densissimum* y *P. armeniacum* en 13.32 µM de BA + 5.3 µM de ANA generó 1 y 1.20 brotes por explante respectivamente (Long *et al.*, 2010), esto contrasta con *B. purpurea* var. *purpurea* donde esta relación solo regeneró 0.20 brotes siendo el tratamiento hormonal menos favorable (Cuadro 6). Chen *et al.* (2005) en 8.88 µM de BA + 2.65 µM de ANA para *Cymbidium faberi* obtuvieron la mejor respuesta de 3.5 brotes, en *B. purpurea* var. *purpurea* solo regeneró 0.87 brotes (Cuadro 6). En las orquídeas *Paphiopedilum insigne* y *Paphiopedilum bellatulum*, 4.44 µM de BA + 2.8 µM ANA dieron 1.0 y 0.33 brotes respectivamente por explante (Long

*et al.*, 2010) a diferencia de *B. purpurea* var. *purpurea* donde se obtuvieron 0.7 brotes por explante de pseudobulbo (Cuadro 6).

Con 8.88  $\mu\text{M}$  de BA Condemarín-Montealegre *et al.* (2007) para *Encyclia microtos* tuvieron dos brotes por explante (yema) hasta los 90 dds. En *Cymbidium faberi* Chen *et al.* (2005) reportaron 1.9 brotes, para *B. purpurea* var. *purpurea* esta concentración originó 0.5 y 1.2 brotes por explante de pseudobulbo en el medio MS a la mitad de sales adicionado con 30 y 20 g  $\text{L}^{-1}$  de sacarosa respectivamente (Cuadro 6), esto denota el efecto de la sacarosa sobre la respuesta organogénica. Existe referencia que la fuente de carbono influye en la respuesta y cantidad de biomasa como lo reportado en *Dendrobium nobile* (De Faria *et al.*, 2004) donde la mejor respuesta es a mayor concentración; sin embargo, en *B. purpurea* var. *purpurea* se obtuvo lo contrario.

Aunque Murashige (1974) reportó para *Cymbidium* que la regeneración de plantas a partir de pseudobulbos es numerosa; dentro de una especie sus genotipos pueden responder de diferente manera aun estando bajo las mismas condiciones de cultivo (Park *et al.*, 2002; Lee y Lee, 2003). Con subcultivos continuos, en tres meses se podrían obtener hasta 30 plántulas de un solo explante.

### **4.3.3 Multiplicación de brotes**

Con la finalidad de incrementar la cantidad de brotes generados por explante, en la etapa de multiplicación se estableció un experimento en el que se probaron diferentes concentraciones de citocininas y auxinas. El medio de cultivo suplementado con 8.88  $\mu\text{M}$  de BA + 5.3  $\mu\text{M}$  de ANA produjo la mejor respuesta con 2.3 brotes por explante ( $P \leq 0.05$ ; Apéndice 5; Cuadro 7; Figura 11), así como el mayor porcentaje de brotes producidos. Esta combinación de citocinina:auxina con estas concentraciones también fue uno de los mejores tratamientos en la fase de inducción de brotes. Tokuhara y Mii (1993) usaron el medio New Dogashima adicionado con 4.44 de BA + 0.53  $\mu\text{M}$  de ANA de la fase de inducción, para la fase de multiplicación obteniendo hasta 10,000 cuerpos parecidos a protocormos en un año. Zhao *et al.* (2013) en *Dendrobium wangliangii*

ocuparon la misma combinación (8.88  $\mu\text{M}$  BA + 0.53  $\mu\text{M}$  ANA), adicionando al medio 100 ml L<sup>-1</sup> de agua de coco obteniendo hasta 7.7 brotes.

Por otra parte Zeng *et al.* (2015) duplicaron el número de brotes de *Paphiopedilum* 'híbridos' después de 12 semanas en un medio adicionado con 13  $\mu\text{M}$  de BA + 1.59  $\mu\text{M}$  de ANA. Sherif *et al.* (2016) reporta de 18 hasta 23 brotes por explantes en callos obtenidos de diferentes tejidos en una concentración de 4.44  $\mu\text{M}$  de BA + 2.65  $\mu\text{M}$  de ANA. Estos datos concuerdan con Roy *et al.* (2011) que mencionan que con el uso de concentraciones bajas de auxinas se evita la disminución de multiplicación de pseudobulbos.

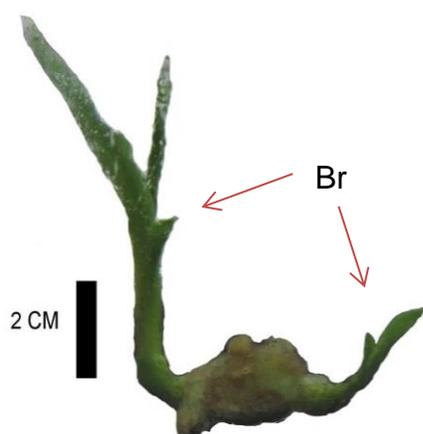


Figura 11. Brotes de *Bletia purpurea* var. *purpurea* en fase de multiplicación cultivados en un medio suplementado con 8.88  $\mu\text{M}$  de BA + 5.3  $\mu\text{M}$  de ANA. Br = Brote.

Cuadro 7. Respuesta organogénica de segmentos de pseudobulbo durante la fase de multiplicación de brotes de *Bletia purpurea* var. *purpurea* después de tres semanas de cultivo.

Citocinina ( $\mu\text{M}$ )		Auxina ( $\mu\text{M}$ )		Brotos por explante	Brotación (%)
-	-	ANA	5.3	1.1 ab	60 a
-	-	AIA	5.3	1.0 ab	60 a
-	-	ANA	2.86	0.7 ab	40 a
-	-	AIA	2.85	1.7 ab	60 a
BA	4.44	-	-	0.7 ab	60 a
BA	4.44	ANA	5.3	1.2 ab	80 a
BA	4.44	AIA	5.3	1.4 ab	80 a
BA	4.44	ANA	2.86	1.0 ab	70 a

BA	4.44	AIA	2.85	1.4 ab	90 a
BA	8.88	-	-	0.9 ab	60 a
BA	8.88	ANA	5.3	2.3 a	90 a
BA	8.88	ANA	2.86	0.7 ab	60 a
BA	8.88	AIA	2.85	0.8 ab	50 a
BA	13.32	-	-	1.2 ab	70 a
BA	13.32	ANA	5.3	0.5 b	30 a
BA	13.32	AIA	5.3	0.6 ab	50 a
BA	13.32	ANA	2.86	0.9 ab	60 a
BA	13.32	AIA	2.85	0.9ab	70 a

AIA = ácido indol-3-acético, ANA = ácido naftalenacético, BA = Benciladenina, KIN = 6-furfuril-aminopurina. <sup>¶</sup>Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (P≤0.05), Brotación=Porcentaje de explantes con respuesta.

La adición individual de citocininas y auxinas en los medios de cultivo no tuvo efectos positivos en la fase de multiplicación, lo cual está en concordancia con lo reportado previamente en otras orquídeas como *Coelogyne suaveolens*, donde la auxina (AIA) retardo el crecimiento y la citocinina (KIN) etioló las plantas. (Sungkumlong y Deb, 2008). Sin embargo, esta respuesta puede variar ampliamente entre especies, ya que en el caso de *Cymbidium faberi* en la que la adición de BA durante la multiplicación de brotes incrementó el número de brotes por explante a 7.9 (Kong *et al.*, 2007; Vyas *et al.*, 2009). Tao *et al.* (2011) reportaron que la tasa de multiplicación fue reduciendo cuando la concentración individual de BA se incrementó.

La generación de nuevos brotes en especies con hábito de crecimiento monopodial es muy reducida debido a que la dominancia del meristemo apical y su crecimiento continuo inhiben el desarrollo de yemas axilares, ocasionando una baja tasa de multiplicación vegetativa (Roy *et al.*, 2011), condición que prevalece durante la propagación *in vitro*. En nuestro estudio, el mejor tratamiento produjo 2.3 brotes por explante de disco de pseudobulbo y de cada pseudobulbo se disecan tres discos, esto significa que de una sola planta se pueden obtener hasta 6.9 brotes. De esta manera al año se pueden obtener de 2 hasta 7 plantas. Debido a que bajo condiciones de micropropagación las tasas de proliferación de propágulos en muchas especies vegetales se ven incrementadas sustancialmente, estas técnicas se han usado

exitosamente para optimizar los sistemas de propagación comercial a gran escala (Aktar *et al.*, 2007).

#### 4.3.4 Enraizamiento *in vitro* de plántulas

La adición de AIB en concentraciones relativamente bajas de 10 y 12.5  $\mu\text{M}$  lograron incrementar significativamente el número de raíces por explante, pero no tuvieron efecto sobre el tamaño de las mismas ni el porcentaje de enraizamiento ( $P \leq 0.05$ , Apéndice 6, Cuadro 8). La longitud promedio de las raíces fue de 2.81 cm.

**Cuadro 8. Respuesta de plántulas durante la fase de enraizamiento de plántulas de *Bletia purpurea* var. *purpurea*, en el medio MS al 50 % de sales, adicionado con sacarosa 20 g  $\text{L}^{-1}$  y ácido indolbutírico (AIB), después de tres semanas de cultivo.**

Auxina ( $\mu\text{M}$ )		Numero de raíces	Tamaño de raíces	Enraizamiento %
AIB	10	10.4 a	2.83 a	100
AIB	12.5	7.0 b	2.79 a	100

<sup>†</sup>Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

La presencia de la auxina en las dos dosis evaluadas fue suficiente para obtener el 100% de enraizamiento de los brotes en un tiempo relativamente corto de 25 días. Debido a esto, se puede mencionar que esta orquídea es una especie de fácil enraizamiento. Con la concentración de 12.5  $\mu\text{M}$  de AIB se obtuvo la mejor respuesta con 10.4 raíces por plántula, lo cual resultó superior al promedio reportado en *Eulophia nuda* donde se obtuvieron 5.7 raíces en medio de cultivo adicionado con esta misma dosis (Nanekar *et al.*, 2014). En otras especies como *Dendrobium primulinum* esta concentración de AIB fue el mejor tratamiento para inducir 2.7 raíces por planta (Pant y Thapa, 2012). También resultó eficiente para inducir el 87% de enraizamiento en *Malaxis acuminata* (Cheruvathur *et al.*, 2010), 97.5% en *Dendrobium nobile* (Asghar *et al.*, 2011), 78.6% en *Cymbidium faberi* (Tao *et al.*, 2011) y 87% en *Eulophia nuda* (Nanekar *et al.*, 2014).

Estos resultados contrastan con lo encontrado en *Esmeralda clarkei*, donde se obtuvo el menor número de raíz (1.33) con 10  $\mu\text{M}$  de IBA hormonal (Paudel y Pant, 2012); o en

*Dendrobium sabin* donde la mejor respuesta (1.22 raíces), fue con la concentración de 10  $\mu\text{M}$  a los 20 días (Rafique *et al.*, 2012). En el caso de plántulas de *Rhynchosstylis retusa*, el 100% de enraizamiento se obtuvo en el medio MS (1962) suplementado con 2  $\mu\text{M}$  de AIB (Thomas y Michael, 2007); también en el género *Dendrobium* se tuvo el máximo de 1.81 raíces con 10  $\mu\text{M}$  de AIB (Aktar *et al.*, 2007).

Aunque el medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) sin adición de hormonas resulta eficiente para promover el enraizamiento en algunas especies (González y Cuevas, 2014), la respuesta se incrementa si se adicionan auxinas, como el AIB que ejerce un fuerte efecto como enraizador (Azcón-Bieto y Talón, 2013). Por su parte, Panwar *et al.* (2012) obtuvieron la mejor respuesta (70%) en un medio basal MS (1962) a una cuarta parte de sus sales para la orquídea *Eulophia nuda*.

Otros trabajos muestran la acción de variaciones de medio de cultivo y compuestos para inducir el enraizamiento, como en *Dendrobium nobile*, donde se utilizó el medio MS (1962) adicionando con 6.24  $\mu\text{M}$  de TDZ y con 25 % de carbón activado (Bhattacharyyan *et al.*, 2014).

Cabe mencionar que durante las fases de inducción de brotes y multiplicación, los explantes de *Bletia purpurea* var. *purpurea* formaron raíces lo que representa una ventaja. Sin embargo, la suplementación del medio de cultivo con AIB incrementó favorablemente el número y longitud de las raíces producidas. Se ha reportado que en algunas especies de plantas no se requiere la adición de hormonas exógenas para inducir raíces y por ello se suele omitir en la fase de enraizamiento (Castillo, 2008).

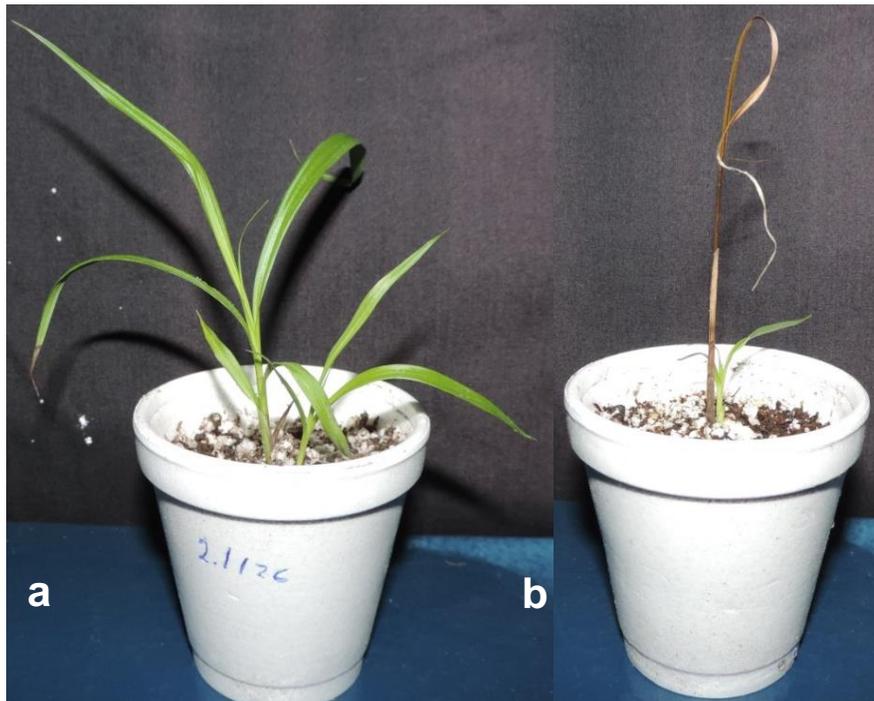
El medio de enraizamiento de *Bletia purpurea* var. *purpurea* a la mitad de la concentración de sales y adicionado con carbón activado favoreció el enraizamiento, similar a lo reportado para *Coelogyne suaveolens* (Sungkumlong y Deb, 2008) y *Cymbidium faberi* (Tao *et al.*, 2011). Además, Liu *et al.* (2002) mencionan que el AIB es una auxina con mayor actividad promotora de enraizamiento, en contraparte de otras

auxinas como el ANA y el AIA; además el AIB se considera un promotor del AIA endógeno.

#### 4.3.5 Aclimatación

En el proceso de aclimatación de plántulas obtenidas *in vitro* se proporcionaron las condiciones ambientales adecuadas para garantizar la supervivencia. Las condiciones de temperatura, luminosidad y humedad relativa se pueden establecer de manera práctica y barata con cubiertas plásticas transparentes como se probó en este estudio y como se ha reportado en otros trabajos recientes (Sherif *et al.*, 2016). Esta etapa es crítica y muy importante, ya que durante la micropropagación las plantas se cultivan bajo condiciones óptimas de humedad, temperatura, fotoperiodo y nutrimentos, pero dado que la humedad relativa es elevada en los contenedores, las plantas desarrollan anomalías morfológicas, anatómicas y fisiológicas que afectan su desempeño y crecimiento, en especial durante los primeros días después del trasplante, ya que las raíces y los estomas de las hojas son poco funcionales y viven en un régimen de heterotrofia. Esto podría limitar su sobrevivencia y reducir sus posibilidades para establecerse en el nuevo ambiente bajo condiciones de invernadero. El porcentaje de supervivencia de plantas enraizadas de *Bletia purpurea* var. *purpurea* fue del 100% después de siete semanas en sustrato agrolita - peat moss (1:1) (Figura 13). Esta respuesta es similar a lo reportado por Dutra *et al.* (2008) para la misma especie *Bletia purpurea* con una supervivencia del 98% a las 15 semanas. Este porcentaje fue mayor que lo alcanzado por Puchooa (2004), donde el porcentaje fue de 84% después de 8 semanas en *Dendrobium* 'Sonia', o en *Dendrobium primulinum* que fue de 70% en mezcla de fibra de coco y musgo (2:1) (Pant y Thapa, 2012). En *Cyrtopodium punctatum* fue de 90% después de cinco semanas con ese mismo método (Dutra *et al.*, 2009).

La combinación agrolita - peat moss, ha demostrado ser eficiente durante esta etapa, ya que mantiene una aireación adecuada, ayuda a almacenar humedad, favorece la adsorción de nutrimentos y posee una elevada capacidad de intercambio de cationes. En muchos casos, no se aplican fertilizantes en esta etapa, pero algunas veces en el riego se adiciona como fertilizante una solución líquida del medio de cultivo MS (1962) a la mitad de concentración de sales ayudar al establecimiento de las plantas en fase (Yanelly *et al.*, 2010). Cuando se cumple la fase de aclimatación se considera superada la propagación (Godo *et al.*, 2010).



**Figura 12. Plantas de *Bletia purpurea* var. *purpurea* a las siete semanas después de la aclimatación en mezcla de agrolita y peat moss.**

El establecimiento de protocolos exitosos, sustentables y con enfoque de propagación masivo-comercial de orquídeas es importante no solo para conocer la fisiología, biología y cultivo de estas plantas y también para explotarse y cubrir la demanda creciente de plantas y flores de orquídeas(Chugh *et al.*, 2009).

## V. CONCLUSIONES

El presente protocolo de regeneración de *Bletia purpurea* var. *purpurea*, aporta conocimiento básico sobre la fisiología y respuestas del cultivo *in vitro* de esta especie silvestre.

El establecimiento exitoso del cultivo aséptico de los explantes originales (cápsulas) se logró al procesarlas con un tratamiento a base de Tween® 20 al 1% durante 10 min, Benlate® + Captan® (8 g L<sup>-1</sup> c/u) durante 30 min, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durante 1 h y NaOCl al 15% + plata coloidal 10% durante 15 min.

El mejor tratamiento para la germinación de las semillas fue el medio MS sin vitaminas, adicionado con sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>), el cual produjo el 100% de germinación a los 33 días después de la siembra.

Durante la etapa de inducción de brotes se obtuvo 1.4 brotes por explante después de tres semanas de cultivo en medio MS al 50 % de sales, adicionado con sacarosa (20 g L<sup>-1</sup>), carbón activado (1g L<sup>-1</sup>), y la combinación de BA + ANA (8.88 + 5.3, 4.44 + 5.3, 8.88 + 10.6 μM)

Durante la fase de multiplicación se logró incrementar la tasa de multiplicación de plantas, ya que se produjeron 2.3 brotes cuando los explantes fueron cultivados con la combinación de 8.88 μM de BA + 5.3 μM de ANA en medio MS adicionado con sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>) y carbón activado (1 g L<sup>-1</sup>).

El mejor tratamiento para el enraizamiento de brotes fue el medio MS a la mitad de concentración de sales, adicionado con 20 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 10 μM de AIB, en el cual se produjo que el 100% de brotes enraizaran después de cuatro semanas de cultivo.

La aclimatación de plántulas fue del 100% de supervivencia después de siete semanas cuando se trasplantaron a un sustrato artificial preparado con una mezcla de agrolita y peat moss (1:1).

## VI. RECOMENDACIONES

Mejorar la metodología de colecta, manejo y conservación de las cápsulas.

Para la colecta, se propone generar accesiones regionales y evaluar la respuesta de diversas poblaciones.

Considerar la polinización manual para el uso de diferentes edades fisiológicas de las semillas y embriones y el posible efecto durante su germinación.

Para la fase de inducción de brotes, ajustar concentraciones de fuente de carbono, así como emplear otras concentraciones y fitohormonas.

Durante la fase de multiplicación probar otras fuentes y concentraciones hormonales para obtener un mayor número de brotes.

En la aclimatación usar fertilización y evaluar su efecto en un periodo mayor.

Evaluar otras rutas morfogénicas, como la organogénesis indirecta o la embriogénesis somática.

## VII. LITERATURA CITADA

- Abraham S., J. Augustine, and T. D. Thomas. 2012. Asymbiotic seed germination and *in vitro* conservation of *Coelogyne nervosa* A. Rich. an endemic orchid to Western Ghats. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 18:3. 245-251.
- Aguilar-Morales M. A., y A. L. López-Escamilla. 2013. Germinación *in vitro* de *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr., Una herramienta para su conservación ex situ, Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledaña. Lincoln, NE: Zea Books. 2. 18.
- Aktar S, K Nasiruddin M and H Huq. 2007. *In vitro* root formation in *Dendrobium* orchid plantlets with IBA. *Journal of Agriculture & Rural Development*. 5:1. 48-51.
- American Orchid Society – AOS. 1988. Manual sobre el Cultivo de Orquídeas. Estados Unidos. pp 5-18.
- Ames O. y D. S. Correll. 1985. Orchids of Guatemala and Belize. Dover Publications, New York.
- Anderson A. B. 1996. The reintroduction of *Platanthera ciliaris* in Canada. *In* North American native terrestrial orchids: propagation and production. Washington DC: North American Native Terrestrial Orchid Conference. 73. 76.
- Ángel C. A., N. Tsubota, J. Leguizamón E., R. Cardenas, B. Chávez, G. Cadena, y A. Bustillo E. 2001. Enfermedades y plagas en Catleas; antecedentes e investigaciones en Colombia. Cenicafe, Chinchina, Colombia.
- Arditti J and A K A Ghani .2000. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytol*. 145. 367-421.
- Arditti J and R Ernst .1984. Physiology of germinating orchid seeds. *In*: Arditti J. 1984. *Orchid biology: Reviews and perspectives*. Cornell University Press. USA. 3.
- Arditti J. 1982. *Orchid Biology: Reviews and Perspective*. Cornell Univ. Press, Ithaca. USA. 2. 352. *In* Zeng S., K. Wu., J. A. Teixeira da Silva., J. Zhang., Z. Chen., N. Xia., and J. Duan. 2012. Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh, an endangered terrestrial orchid. *Scientia Horticulturae*. 138. 198-209.

- Arditti J. 1984. An history of orchid hybridization, seed germination and tissue culture. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 89:4. 359-381.
- Arditti J. 1990. *Micropropagation of Orchids*. California University. USA. 606 p.
- Arditti J. and R. Ernst. 1984. Physiology of germinating orchid seeds. *In*: Arditti J. 1984. *Orchid biology: Reviews and perspectives*. Cornell University Press. USA. 3.
- Asghar S., T. Ahmad, I. A. Hafiz and M. Yaseen. 2011. *In vitro* propagation of orchid *Dendrobium nobile* var. Emma White. *African Journal of Biotechnology*. 10:16. 3097-3103.
- Ávila-Díaz I., K. Oyama, C. Gómez-Alonso & R. Salgado-Garciglia. 2009. *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 99:3. 335-343.
- Azcón-Bieto J y M Talón .2013. *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGraw-Hill Interamericana. España.
- Batygina T. B., E. A. Bragina y V. E. Vasilyeva. 2003. The reproductive system and germination in orchids. *Acta Biológica Cracoviensia. Series Botánica* 45:2 21-34.
- Bektaş E., M. Cüce & A. Sökmen. 2013. *In vitro* germination, protocorm formation, and plantlet development of *Orchis coriophora* (Orchidaceae), a naturally growing orchid species in Turkey. *Turkish Journal of Botany*. 37:2. 336-342.
- Benzing D. H. 1990. *Vascular epiphytes: general biology and related biota*. Cambridge University Press.
- Bewley J. D. y M. Black. 1994. *Seeds: Physiology of Development and Germination*. Plenum Press, New York. 462 pp.
- Bhattacharjee B., S. Islam and S. Subramaniam. 2015. Rapid development of PLBs derived from immature seeds and mass multiplication of *Vanda tessellata* (Roxb.) Hook. Ex G. Don-A Threatened Orchid species in Bangladesh. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. 25:2. 181-191.
- Bhattacharyya P., S. Kumaria, R. Diengdoh & P. Tandon. 2014. Genetic stability and phytochemical analysis of the *in vitro* regenerated plants of *Dendrobium nobile* Lindl., an endangered medicinal orchid. *Meta gene*. 2. 489-504.

- Buyun L., A. Lavrentyeva, L. Kovalska & R. Ivannikov. 2004. *In vitro* germination of seeds of some rare tropical orchids. Acta Universitatis Latviensis, Biology (Latvia). 676. pp 159-162.
- Castillo A. 2008. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Las Brujas, Uruguay: AR-VITRO, INIA.
- Chen Y., X. Liu & Y. Liu. 2005. *In vitro* plant regeneration from the immature seeds of *Cymbidium faberi*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 81:2. 247-251.
- Cheruvathur M. K., J. Abraham, B. Mani and T. D. Thomas. 2010. Adventitious shoot induction from cultured internodal explants of *Malaxis acuminata* D. Don, a valuable terrestrial medicinal orchid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 101:2. 163-170.
- Chugh A. y P. Khurana. 2002. Gene expression during somatic embryogenesis-recent advances. Current Science. 83:6 715-730
- Chugh S., Guha S., & U. I. Rao. 2009. Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants. Scientia Horticulturae.122:4. 507-520.
- Chutima R., B. Dell & S. Lumyong. 2011. Effects of mycorrhizal fungi on symbiotic seed germination of *Pecteilis susannae*. (L.) Rafin (Orchidaceae), a terrestrial orchid in Thailand. Symbiosis. 53:3. 149-156.
- Chutima R., B. Dell, S. Vessabutr, B. Bussaban & S. Lumyong. 2011. Endophytic fungi from *Pecteilis susannae* (L.) Rafin (Orchidaceae), a threatened terrestrial orchid in Thailand. Mycorrhiza. 21:3. 221-229.
- Condemarín-Montealegre C. E., J. Chico-Ruíz, y C. Vargas-Arteaga. 2007. Efecto del ácido indolbutírico (IBA) y 6-bencilaminopurina (BAP) en el desarrollo *in vitro* de yemas axilares de *Encyclia microtos* (RCHB.F.) Hoehne (Orchidaceae), Lankesteriana 7:1-2. 247-254.
- Cousineau J. C., D. J. Donnelly. 1991. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of tissue cultured and greenhouse-grown raspberry. Plant Cell, Tissue. Org. Cult. 27. 249-255.

- De Faria R. T., F. N. Rodrigues, L. D. Oliveira & C. Müller. 2004. *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. *Horticultura Brasileira*. 22:4. 780-783.
- De Pauw M. A, W. R. Remphrey & C. E. Palmer. 1995. The cytokinin preference for *in vitro* germination and protocorm growth of *Cypripedium candidum*. *Annals of Botany*. 75:3. 267-275.
- Deb C. R. & S. Temjensangba. 2006. *In vitro* propagation of threatened terrestrial orchid, *Malaxis khasiana* Soland ex. Swartz through immature seed culture. *Indian Journal of Experimental Biology*. 44:9. 762.
- Devi C. G., M. Damayanti y G. J. Sharma. 1998. Aseptic embryo culture of *Vanda coerulea* Grief., *J Orchid Soc. India* 12 83
- Dixon K. W., P. J. Cribb, S. P. Cell, R. L. Barrett (Eds.). 2003. *Orchid conservation*. Kota Kinabalu, Sabah: Natural History Publications.
- Domokos M., 1976. Ein Beitrag zur Geschichte den Orchideenzuchtung. *Die Orchidee*, 27: 178-181. *In* Arditti J. 1984. An history of orchid hybridization, seed germination and tissue culture. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 89.4., 359-381.
- Dunsterville G. C. K. & L. A. Garay. 1961. *Venezuelan orchids illustrated*. André Deutsch, London.
- Dutra D. M., E. Kane and L. Richardson. 2009. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 96: 235-243. DOI 10.1007/s11240-008-9480-z.
- Dutra D., T. R. Johnson, P. J. Kauth, S. L. Stewart, M. E. Kane & L. Richardson. 2008. Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 94:1. 11-21.
- Espejo S. A. y A. R. López F. 1998. *Las monocotiledóneas mexicanas. Una sinopsis florística*. 1. Lista de referencia. Parte VIII. Orchidaceae 2. Consejo Nacional de la Flora de México, A.C. México, D.F. pp 115.
- Eymar E., J. Alegre, M. Toribio & D. López-Vela. 2000. Effect of activated charcoal and 6-benzyladenine on *in vitro* nitrogen uptake by *Lagerstroemia indica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 63:1. 57-65.
- Fay M. F. 1994. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservations? *Biodiversity & Conservation*. 3:2. 176-183.

- Fehér A. 2005. Why Somatic Plant Cells Start to form Embryos? *In: Somatic Embryogenesis*. (Ed.) A. Mujib & J. Samaj. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 85-101.
- Fenner M. (Ed). 2000. Seeds: the ecology of regeneration in plant communities, 2nd. CAB International publishing, Wallingford.
- Feng J. H. and J. T. Chen. 2014. A novel *in vitro* protocol for inducing direct somatic embryogenesis in *Phalaenopsis aphrodite* without taking explants. *The Scientific World Journal*.
- Fischer A. L. 2007. Cultivo de Orquídeas/Cultivation of Orchids. Imaginador.
- Flores-Escobar G., J. Legaria-Solano P., I. Gil-Vásquez, M. T. Colinas-León. 2008. Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. Una orquídea amenazada y endémica de México, *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14.3.: 347-353.
- Franklin C. I., T. N. Trieu, R. A. Gonzales & R. A. Dixon. 1991. Plant regeneration from seedling explants of green bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 24:3. 199-206.
- Gamborg O. L., R. A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res*. 50.1.: 151-158.
- García-Cruz J. y S. Victoria. 1998. Fascículo 106: ORCHIDACEAE I Clave subfamilias y Tribus. Flora de Veracruz, Instituto de Ecología A. C. Veracruz. México.
- García-Peña M. R. y M. Peña. 1981. Uso de las orquídeas México desde la época prehispánica hasta nuestros días. *Orquídea*. México. 8:1. 59-86.
- George E. F., M. A. Hall y G. J. De Klerk. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture* 3rd Edition. Springer. 1. 479p.
- Godo T., M. Komori, E. Nakaoki, T. Yukawa & K. Miyoshi. 2010. Germination of mature seeds of *Calanthe tricarinata* Lindl, an endangered terrestrial orchid, by asymbiotic culture *in vitro*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 46:3. 323-328.
- González Y. y A. Cueva. 2014. Efectos del fotoperiodo, reguladores de crecimiento vegetal y medio de cultivo en el crecimiento *in vitro* de plántulas de *Cyrtochilum loxense* (Lindl.) Kraenzl. una orquídea endémica del Ecuador. *Revista peruana de biología*. 21:2. 189-192.

- Graham J., L. Iasi and S. Millam. 1997. Genotype-specific regeneration from a number of *Rubus* cultivars. *Plant Cell, Tissue. Org. Cult.* 48. 167-173.
- Gresshoff P. M. y C. H. Doy. 1974. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (Tomato). *Planta.* 107. 161-170.
- Hall R. D. 2000. Plant cell culture initiation. *Molecular biotechnology.* 16.2. 161-173.
- Harvais G. 1982. An improved culture medium for growing the orchid *Cypripedium reginae* axenically. *Canadian Journal of Botany.* 60.12. 2547-2555.
- Hernández R. M., E. Diosdado, F. Coll y J. C. Cabrera. 2010. Efecto de los biorreguladores del crecimiento en la embriogénesis somática de mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.). *Cultivos Tropicales.* 31.3.
- Ikeda M., M. Umehara and H. Kamada. 2006. Embryogenesis-related genes; its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology.* 23. 153-161.
- Iriondo A. J. M. 2001. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. *Investigación agraria. Producción y protección vegetales.* 16:1. 5-24
- Iriondo J. M. y C. Pérez. 1999. Propagation from seeds and seed preservation. *In: A color atlas of plant propagation and conservation.* Bowes B. G. (ed.), Manson publishing. London. pp. 46-57.
- Jiménez M. R. 2001. Fascículo 119: Orchidaceae IV Tribu Maxillarieae: *Amparoa*, *Brassia* y *Comparettia*. *Flora de Veracruz, Instituto de Ecología A. C. Veracruz. México.*
- Johnson M. and N. Janakiraman. 2013. Phytochemical and TLC studies on stem and leaves of the orchid *Dendrobium panduratum* subsp. *villosum* Gopalan & AN Henry. *Indian Journal of Natural Products and Resources.* 4. 250-254.
- Johnson T. J., M. E. Kane and H. E. Pérez. 2011. Examining the interaction of light, nutrients and carbohydrates on seed germination and early seedling development of *Bletia purpurea* (Orchidaceae). *Plant Growth Regulation.* 63: 89-99. DOI 10.1007/210725-010-9516-3.
- Johnson T. R., S. L. Stewart, D. Dutra, M. E. Kane and L. Richardson. 2007. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae)-

preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 90:3. 313-323.

- Kao K. N. and M. R. Michayluk. 1975. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta*, 126:2. 105-110.
- Kauth P. J., Kane, M. E. y W. A. Vendrame. 2011. Comparative *in vitro* germination ecology of *Calopogon tuberosus* var. *tuberosus* (Orchidaceae) across its geographic range. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47.1. 148-156.
- Kauth P. J., W. A. Vendrame & M. E. Kane. 2006. *In vitro* seed culture and seedling development of *Calopogon tuberosus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 85:1. 91-102.
- Knudson L. 1921. La germinación no simbiótica de las semillas de orquídeas. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural*. 21. 250-260.
- Knudson L. 1946. A nutrient for germination of orchids. *Am. Orchid Soc. Bull.* 15. 214–17.
- Kong Q., S. Y. Yuan and G. Y. Végvári. 2007. Micropropagation of an orchid *Dendrobium strongylanthum* Rchb.f. *International Journal of Horticultural Science*. 13. 61–64.
- Krikorian A. D. y W. Roca M. 1991a. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. *In: Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. W. Roca M. & L. Mroginski A. (Eds.) No 157 CIAT 41-77.
- Krikorian A. D. y W. Roca M. 1991b. Propagación clonal *in vitro*. *In: Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. W. Roca M. & L. Mroginski A. (Eds.). 157. 95-125pp.
- Laux T. and G. Jürgens. 1997. Embryogenesis: a new start in life. *The Plant Cell*. 9:7 989.
- Lee Y. I. y N. Lee. 2003. Plant regeneration from protocorm-derived callus of *Cypripedium formosanum*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 39. 475-482.
- Lewis W. E. 1977. *Medical Botany*. John Wiley & Sons New York. 515 pp. *In: García-Peña, M. R. y M. Peña*. 1981. Uso de las orquídeas México desde la época prehispánica hasta nuestros días. *Orquídea*. México 8:1. 59-86.
- Lindemann E. G. P., Gunckel J. E. & Davidson O. W. 1970. Meristem culture of *Cattleya*. *Bulletin. American Orchid Society*. 39. 1002-4.

- Linsmaier E. M. and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*.18:1. 100-127.
- Litvay J. D., Verma D. C. & M. A. Johnson. 1985. Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.). Culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Reports*. 4.6. 325-328.
- Liu C, J Zhu, Z Liu, L Li, R Pan and L Jin. 2002. Exogenous auxin effects on growth and phenotype of normal and hairy roots of *Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi. *Plant Growth Regulation*. 38. 37-43.
- Long B., A. X. Niemiera, Z. Y. Cheng and C. L. Long. 2010. *In vitro* propagation of four threatened *Paphiopedilum* species (Orchidaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 101:2. 151-162.
- López A. F. J., N. R. Tenjo G., G. Fischer. y D. Miranda L. 2008. Propagación de uchuva (*Physalis peruviana* L.) mediante diferentes tipos de esquejes y sustratos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía. Medellín*. 61:1. 4347-4357.
- López-Gómez P., L. Iracheta-Donjuan, M. Castellanos-Juárez, I. Méndez-López, A. Sandoval-Esquivez, J. F. Aguirre-Medina, M C. Ojeda-Zacarías y A. Gutiérrez-Díez. 2010. Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 33:3. 205-213.
- Luer C. A. 1972. The native orchids of Florida. The New York Botanical Garden, Bronx.
- Mahendran G and V. Narmatha B. 2009. Mass propagation of *Satyrium nepalense* D. Don. A medicinal orchid via seed culture. *Scientia Horticulturae*. 119. 203–207.
- Malmgren S. 1996. Orchid propagation: theory and practice. In *North American native orchids: propagation and production*.
- Mary S. S. and K. M. Divakar. 2015. *In vitro* propagation of *Phaius luridus thwaites* - A terrestrial and endemic orchid of Western Ghats. *International Journal of Scientific Research in Science, Engineering and Technology*. 1:5. 356-360.
- McLeish I., N. R. Pearce and B. R. Adams. 1995. Native orchids of Belize. Balkema, Rotterdam.
- McVaugh R. 1985. Flora Novo-Galiciana. Vol. 16. Orchidaceae. The University of Michigan Press. USA. 363 p.
- McVaugh, R. 1989. Orchidaceae. Pages 1–366. In: W. R. Anderson (Ed.). Flora Novo-Galiciana. Vol. 16. University of Michigan Press, Ann Arbor.

- Mejía R. 2015. Cuidados para mantener orquídeas bellas y sanas en maceta, Ornamentales & Jardinería. 10: 39. 22-23pp.
- Mroginski L. A. y Roca, W. M. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones CIAT.
- Mukherjee S. K., B. Rathinasabapathi and N. Gupta. 1991. Low sugar and osmotic requirements for shoot regeneration from leaf pieces of *Solanum melongena* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 25:1. 13-16.
- Murashige T and F Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15. 473-479.
- Murashige T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Annual Review Plant Physiology. 25. 135-66.
- Nanekar V., V. Shriram, V. Kumar and P. K. Kishor. 2014. Asymbiotic *in vitro* seed germination and seedling development of *Eulophia nuda* Lindl, an endangered medicinal orchid. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences. 84:3. 837-846.
- Neumann K. H., Imani J. and Kumar A. 2009. Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology, Principles and Practice, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp 325.
- Nikabadi S, E Bunn, J Stevens, B Newman, S R Turner and K W Dixon. 2014. Germination responses of four native terrestrial orchids from south-west Western Australia to temperature and light treatments. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 118:3. 559-569.
- Niknejad A, M A Kadir and S B Kadzimin .2011. *In vitro* plant regeneration from protocorms-like bodies (PLBs) and callus of *Phalaenopsis gigantea* (Epidendroideae: Orchidaceae). African Journal of Biotechnology. 10:56. 11808-11816.
- Nitsch J. P. and C. Nitsch. 1969. Haploid plants from pollen grains. Science. 163:3862. 85-87.
- Ospina J. T. O., & P. Bayman. 2009, Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epífitas. Acta Agronómica. 4. 270-276.
- Pacek-Bieniek A., M. Dyduch-Siemińska & M. Rudaś. 2010. Influence of activated charcoal on seed germination and seedling development by the asymbiotic method in *Zygostates grandiflora* (Lindl.) Mansf. (Orchidaceae). Folia Horticulturae. 22:2. 45-50.

- Palestina R. A. and V Sosa. 2002. Morphological variation in populations of *Bletia purpurea* (Orchidaceae) and description of the new species *B. riparia*. *Brittonia*. 54:2. 99-111.
- Pant B and D Thapa. 2012. *In vitro* mass propagation of an epiphytic orchid, *Dendrobium primulinum* Lindl. through shoot tip culture. *African Journal of Biotechnology*. 11:42. 9970-9974.
- Panwar D., K. Ram and N. S. Shekhawat. 2012. *In vitro* propagation of *Eulophia nuda* Lindl, an endangered orchid. *Scientia Horticulturae*. 139. 46-52.
- Park S. Y., H. N. Murthy and K. Y. Paek. 2000. *In-vitro* seed germination of *Calanthe sieboldii*, an endangered orchid species. *Journal of Plant Biology*. 43:3. 158-161.
- Park S. Y., H. N. Murthy and K. Y. Paek. 2002, Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 38. 168-172.
- Paudel M R and B Pant .2012. *In vitro* plant regeneration of *Esmeralda clarkei* Rchb.f. via protocorm explant. *African Journal of Biotechnology*. 11:54. 11704-11708.
- Pedroza-Manrique J and Y. Mican-Gutiérrez. 2006. Asymbiotic germination of *Odontoglossum gloriosum* RCHB. F (Orchidaceae) under *in vitro* conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 42:6. 543-547.
- Pedroza-Manrique J., C. Fernández-Lizarazo and A. Suarez-Silva. 2005. Evaluation of the effect of three growth regulators in the germination of *Compartmentia falcata* seeds under *in vitro* conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 41:6. 838-843.
- Pons T. L. 2000. Seed responses to light. *In: Fenner M (Ed) Seeds: the ecology of regeneration in plant communities*, 2nd. CAB International publishing, Wallingford, pp 237-260.
- Puchooa D. 2004. Comparison of different culture media for the *in vitro* culture of *Dendrobium* (Orchidaceae). *International Journal of Agriculture & Biology*. 6:1. 884-888 pp.
- Rafique R., B. Fatima, S. Mushtaq, S. Iqbal M., M. Rasheed, M. Ali & U. Hasan U. 2012. Effect of indole-3-butyric acid (IBA) on *in vitro* root induction in *Dendrobium* orchid (*Dendrobium sabin* H.). *African Journal of Biotechnology*. 11:20. 4673-4675.

- Rivera C. G. 1998, Orquídeas: generalidades y cultivo. Heredia. Costa Rica. Editorial Fundación UNA. 266 p.
- Rodríguez L., R. González, A. Díaz, E. Fajardo, E. Sánchez, J. Hernández, M. A. Castañeira, G. De La Cruz y J. González. 2005. Producción y recuperación de orquídeas silvestres cubanas.
- Roy A. R., R. Patel S., V. V. Patel, S Sajeev, B C Deka .2011. Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex. Lindl. (Blue Vanda): An *in vitro* protocol for an endangered orchid. *Scientia Horticulturae*. 128. 325-331.
- Santos D M S y C Carranza A .2009. Plant regeneration through direct shoot formation from leaf cultures and from protocorm-like bodies derived from callus of *Encyclia mariae* (Orchidaceae), a threatened Mexican orchid. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 45:2. 162-170.
- Salazar-Casasa W., G. Rivera-Coto, y G. Corrales-Moreira. 2007. Comparación de los problemas fitosanitarios en orquídeas de poblaciones silvestres y de cultivo, como evaluación de riesgos de plagas o epidemias.
- Santos-Hernández L., M. Martínez-García., J. E. Campos & E. Aguirre-León. 2005. *In vitro* propagation of *Laelia albida* (Orchidaceae) for conservation and ornamental purposes in Mexico. *HortScience*.40:2. 439-442.
- Sarasan V, R Cripps, M Ramsay M., C. Atherton, M. McMichen, G. Prendergast and J. K. Rowntree. 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants-progress in the past decade. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 42:3. 206-214.
- SAS .2002. Institute Inc., Cary, NC, USA.
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059- 2010, Protección Ambiental-Especies nativas de México de Flora y Fauna Silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de Especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación 30 diciembre. México.
- Sherif N. A., T. S. Kumar and M. V. Rao. 2016. *In vitro* regeneration by callus culture of *Anoectochilus elatus* Lindley, an endangered terrestrial jewel orchid. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 52:1. 72-80.
- Smith R. H. 2013. Plant tissue culture: techniques and experiments. Academic Press.
- Sosa V. 1994a. A revision of the *Bletia reflexa* complex (Orchidaceae). *Lindleyana*. 9: 7–17.

- Sosa V. 1994b. *Bletia greenwoodiana* (Orchidaceae), a new species from Durango, Mexico. *Brittonia*. 46: 113–115.
- Sosa V. and M. Díaz-Dumas. 1998. Orchids of the Greater Antilles: I. A new species of *Bletia*. *Brittonia* 49: 77–83.
- Soto-Arenas M. A., E. Hágsater, R. Jiménez-Machorro, G. Salazar C., R. Solano G y R. Flores. 2007. Las orquídeas de México. Catálogo digital. Institute Chinois, A.C., Mexico City. DVD.
- Stewart S. L. and M. E. Kane .2006. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 86:2. 147-158.
- Sungkumlong & Deb C. R. 2008. Effects of different factors on immature embryo culture, PLBs differentiation and rapid mass multiplication of *Coelogyne suaveolens* (Lindl.) Hook. *Indian journal of experimental biology*. 46.4. 243.
- Taiz L. & E. Zeiger. 2010. *Plant Physiology*. Sinauer Associates. Inc. ISBN 10: 0878938664/ISBN 13: 9780878938667.
- Tan X. M., C. L. Wang, X. M. Chen, Y. Q. Zhou, Y. Q. Wang, A. X Luo, H. L. Zhi and S. X. Guo. 2014. *In vitro* seed germination and seedling growth of an endangered epiphytic orchid, *Dendrobium officinale*, endemic to China using mycorrhizal fungi (*Tulasnella* sp.). *Scientia Horticulturae*. 165. 62-68.
- Tao J., L. Yu, F. Kong and D. Zhao. 2011. Effects of plant growth regulators on *in vitro* propagation of *Cymbidium faberi* Rolfe. *African Journal of Biotechnology*. 10:69. 15639-15646.
- Tapia G. T. y Monroy, M. R. 2007. La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales *in vitro*. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*. 32:10. 669-674.
- Teixeira da Silva J. A., E. A. Tsavkelova, T. Bun N., S. Parthibhan, J. Dobránszki, J. C. Cardoso and S. Zeng. 2015. Asymbiotic *in vitro* seed propagation of *Dendrobium*. *Plant Cell Reports*. 34:10. 1685-1706. DOI 10.1007/s00299-015-1829-2.
- Temjensangba S. y C. R. Deb. 2006. Effect of different factors on non-symbiotic seed germination, formation of protocorm-like bodies and plantlet morphology of *Cleisostoma racemiferum* (Lindl.). *Indian Journal of Biotechnology*. 5. 223-228.
- Thomale H. 1954. Die Orchideen. Eugen Ulmer, Stuttgart, pp. 62–88. *In* Zeng, S., Wu, K., da Silva, J. A. T., Zhang, J., Chen, Z., Xia, N., y Duan, J. .2012.. Asymbiotic

seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh, an endangered terrestrial orchid. *Scientia Horticulturae*, 138, 198-209.

Thomas T. D. and A. Michael .2007. High-frequency plantlet regeneration and multiple shoot induction from cultured immature seeds of *Rhynchosstylis retusa* Blume, an exquisite orchid. *Plant Biotechnology Reports*. 1:243–249. DOI 10.1007/s11816-007-0038-z.

Tokuhara K. and M. Mii. 1993. Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. *Plant Cell Reports*. 13:1. 7-11.

Torrey J. G. and J. Reinert. 1961. Suspension cultures of higher plant cells in synthetic media. *Plant Physiology*. 36:4. 483-491.

Tran T. V. K. M. 1981. Control of morphogenesis *in vitro* cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, 32.1., 291-311.

Tran T. V. M. 1973. *In vitro* control of de *novo* flower, bud, root, and callus differentiation from excised epidermal tissues.

Trópicos. 2016. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org/Name/23503194>. Consultado el 17 de abril 2016.

Turk B. A., H. J. Swartz and R. H. Zimmerman. 1994. Adventitious shoot regeneration from *in vitro*-cultured leaves of *Rubus* genotypes. *Plant Cell, Tiss.Org. Cult.* 38. 11-17.

Udomdee W., P. J. Wen, C. Y. Lee, S. W. Chin and F. C. Chen. 2014. Effect of sucrose concentration and seed maturity on *in vitro* germination of *Dendrobium nobile* hybrids. *Plant growth regulation*. 72:3. 249-255.

Vacin E. F. and F. W. Went. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. *Botanical Gazette*. 605-613.

Valle-Sandoval M. R., J. O. Mascorro-Gallardo, I. Gil-Vázquez and G. Iturriaga-de la Fuente. 2008. Regeneración directa *in vitro* del crisantemo, *Dendranthema X grandiflorum* Kitam, a partir de segmentos de tallo. *Universidad y Ciencia*. 24.3. 219-227.

Van Waes J. and P. C. Debergh.1986. *In vitro* germination of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum*. 67.2. 253-261.

Vejsadová H. 2006. Factors affecting seed germination and seedling growth of terrestrial orchids cultured *in vitro*. *Acta Biológica Cracoviensia. Series Botánica*, 48:1. 109-113.

- Villalobos A. V. M. y T. A. Thorpe. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. *In: Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones.* W. Roca M. y L. Mroginski A. (Eds.) No 157 CIAT pp 127-141.
- Vyas S., S. Guha, M. Bhattacharya and I. U. Rao. 2009. Rapid regeneration of plants of *Dendrobium lituiflorum* Lindl. (Orchidaceae) by using banana extract. *Scientia Horticulturae*. 121. 32–37.
- Vyas S., S. Guha, P. Kapoor and I U Rao .2010. Micropropagation of *Cymbidium* Sleeping Nymph through protocorm-like bodies' production by thin cell layer culture. *Scientia Horticulturae*.123:4. 551-557.
- White P. R. 1963. The cultivation of animal and plant cells. Ronald Press, New York pp 57-63.
- Williams E. S. and B. Maheswaran. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cell as an embryogenic group. *Annals of Botany*. 57. 443-462.
- Williams L. O. and P. A. Allen. 1980. Orchidaceae of Panama. *Monogr. Missouri Bot. Gard.* 4. 1-115.
- Withner C. L. 1980. The bifoliate Cattleyas. *Proceedings of the Ninth World Orchid Congress, Bangkok*. 65.
- Yanelly C. C., C. L. Miceli, C. Orantes, L. Dendooven and F. A. Gutiérrez. 2010. Plant growth regulators optimization for *in vitro* cultivation of the orchid *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressier & WE Higgins/Optimización de reguladores de crecimiento para el cultivo *in vitro* de la orquídea *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressier & WE Higgins. *Gayana. Botánica*. 67:1 19-26 p.
- Zawadzka M. and T. Orlikowska. 2006. Factors modifying regeneration *in vitro* of adventitious shoots in five red raspberry cultivars. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 14. 105.
- Zeng S. J., Z. L. Chen, K. L. Wu, J. X. Zhang, C. K. Bai, J. A. T Teixeira da Silva and J. Duan. 2011. Asymbiotic seed germination, induction of calli and protocorm-like bodies, and *in vitro* seedling development of the rare and endangered *Nothodoritis zhejiangensis* Chinese orchid. *HortScience*. 46:3. 460-465.
- Zeng S., K. Wu, J. A. Teixeira da Silva, J. Zhang, Z. Chen, N. Xia and J. Duan. 2012. Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh, an endangered terrestrial orchid. *Scientia Horticulturae*, 138, 198-209.

- Zeng S., S. Liang, Y. Y. Zhang, K. L. Wu, J. A. T Teixeira da Silva and J. Duan. 2013. *In vitro* flowering red miniature rose. *Biología Plantarum*. 57:3. 401-409.
- Zeng S., W. Huang, K. Wu, J. Zhang, J. A. Teixeira da Silva and J. Duan. 2015. In vitro propagation of Paphiopedilum orchids. *Critical reviews in biotechnology*. 36:3. 521-534.
- Zhang Y., Y. I. Lee, L. Deng and S. Zhao. 2013. Asymbiotic germination of immature seeds and the seedling development of *Cypripedium macranthos* Sw., an endangered lady's slipper orchid. *Scientia Horticulturae*. 164. 130-136.
- Zhao D., G. Hu, Z. Chen, Y. Shi, L. Zheng, A. Tang and C. Long. 2013. Micropropagation and *in vitro* flowering of *Dendrobium wangliangii*: a critically endangered medicinal orchid. *Journal of Medicinal Plants Research*. 7:28. 2098-2110.

## VIII. APÉNDICE

**Apéndice 1. Composición del medio basal MS (Murashige y Skoog (1962). Ocupado para el establecimiento del protocolo de propagación *in vitro* de *Bletia purpurea* var. *purpurea***

Sales Inorgánicas		Compuestos Orgánicos	
Macronutrientes	Micronutrientes	mg L <sup>-1</sup>	
mg L <sup>-1</sup>			
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,650	KI	0.83
KNO <sub>3</sub>	1,900	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.3
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25
		CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
		CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025
		FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8
		Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37.3
		Inositol	100
		Ácido Nicotínico	0.05
		Piridoxina.HCl	0.5
		Tiamina. HCl	0.1
		Glicina	2
		Sacarosa	3 %

**Apéndice 2. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de tratamientos en la fase de inducción de germinación *in vitro* de *Bletia purpurea* var. *purpurea*.**

Fuente de variación	Inducción de germinación
Tratamiento	1.04*
Error	0.12
C. V.	94.28
R <sup>2</sup>	0.55
Media	0.37
Pr > F	0.0009

\*=significativo. \*\*=No significativo, C V= Coeficiente de variación

**Apéndice 3. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza del tipo de explante en la fase de inducción de brotes de *Bletia purpurea* var. *purpurea*.**

Fuente de variación	Brotos por explante
Tratamiento	0.03
Explante	0.44
Interacción: Explante/Tratamiento	0.16
Error	0.13
C. V.	44.02
R <sup>2</sup>	0.12
Media	0.83

\*=significativo. \*\*=No significativo, C V= Coeficiente de variación

**Apéndice 4. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza del explante en la fase de inducción de brotes de *Bletia purpurea* var. *purpurea*.**

Fuente de variación	Inducción de brotes	Brotación
Tratamiento	1.05*	0.70
Error	0.43	0.17
C. V.	78.36	64.89
R <sup>2</sup>	0.21	0.30
Media	0.84	0.64

\*=significativo. NS=No significativo, C V= Coeficiente de variación

**Apéndice 5. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza en la fase de multiplicación de brotes de *Bletia purpurea* var. *purpurea*.**

Fuente de variación	Multiplicación de brotes	Brotación
Tratamiento	1.36**	1.93
Error	0.82	1.26
C. V.	283.73	54.67
R <sup>2</sup>	0.14	0.13
Media	0.32	2.05

\*=significativo. \*\*=No significativo, C V= Coeficiente de variación

**Apéndice 6. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la fase de enraizamiento de brotes de *Bletia purpurea* var. *purpurea*.**

Fuente de variación	Numero raíces	Tamaño de raíces
Tratamiento	57.80*	0.0088**
Error	4.57	0.42
C. V.	24.59	23.16
R <sup>2</sup>	0.41	0.001
Media	8.70	2.8170

\*=significativo. \*\*=No significativo, C V= Coeficiente de variación