



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GENETICA

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Laelia halbingeriana* Y SU PROPAGACIÓN *in vitro*

YURIXHI ATENEA RAYA MONTAÑO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

AGOSTO 2013

La presente tesis titulada: "Caracterización molecular de *Laelia halbingeriana* y su propagación *in vitro* realizada por el alumno: Yurixhi Atenea Raya Montaña, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GENETICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

DR. GUILLERMO CARRILLO CASTAÑEDA

ASESOR

DRA. MARTHA ELENA PEDRAZA SANTOS

ASESOR

DR. TARSICIO CORONA TORRES

ASESOR

DR. JOSÉ ALFREDO CARRILLO SALAZAR

ASESOR

DR. ERNESTO GABRIEL ALCANTAR GONZÁLEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, agosto de 2013

RESUMEN GENERAL

Laelia halbingeriana pertenece a la familia *Orchidaceae* y debido a su descubrimiento relativamente reciente, no se ha caracterizado morfológica, cromosómica ni molecularmente. Con la finalidad de conocer la diversidad de esta especie y su posible relación con *L. anceps*, *L. superbiens* y *L. autumnalis*, la caracterización molecular mediante el análisis de RAPDs se utilizaron 16 iniciadores, cuatro iniciadores mostraron productos de amplificación aceptable. Se observó 60.97 % de polimorfismo que denota gran variabilidad entre las especies de *Laelia*. Por otra parte se observó que el número cromosómico más común es de $2n=36$. Además, en un tercer estudio se desarrolló una metodología para la propagación *in vitro* de *L. halbingeriana* se utilizó el medio de MS (1962) suplementado con 6-benciladenina (BA) (0.0, 2.22 y 4.43 $\mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$) y 3-ácido naftalenacético (ANA) (0.0, 2.60, 5.20 y 10.40 $\mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$). Con estos medios fueron cultivadas plántulas de 2.5 cm con tres concentraciones de sacarosa (58.43, 87.64 y 116.85 $\text{mM}\cdot\text{litro}^{-1}$) y cinco de sales minerales del medio MS (50, 75, 100, 125 y 150 %). Para el enraizamiento, las plántulas fueron cultivadas en medio MS suplementado con cinco concentraciones de ANA (0.0, 2.60, 7.80, 10.40 y 13.00 $\mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$) y cinco de ácido 3-indolbutírico (AIB) (0.0, 4.92, 7.38, 9.84 y 12.30 $\mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$). Se utilizó el diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial y diez repeticiones. En la etapa de multiplicación, el BA (2.22 $\mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$) incrementó el número promedio de hojas por planta (3.93), mientras que la mayor longitud (1.11 cm) se logró al adicionar ANA (5.20 $\mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$). La concentración de azúcar y las sales minerales no influyeron en la organogénesis *in vitro* de *L. halbingeriana*. En el enraizamiento, el mayor número de raíces por planta (2.62) se obtuvo reduciendo las sales minerales a 75 %, la adición de 7.80

$\mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$ de ANA incrementó el número de raíces (2.86). Las plántulas provenientes del cultivo de tejidos fueron cultivadas en charolas de plástico en condiciones de invernadero. Los sustratos utilizados fueron la corteza de encino y el peat moss, con y sin enraizador, se comparó el crecimiento y desarrollo de las plántulas *in vitro* e *in vivo*. Después de 8 meses del inicio de los experimentos, las variables evaluadas fueron: altura de planta, número y longitud de hojas, número y longitud de raíces. La reflectancia de las hojas estuvo influenciada por el contenido de sales minerales así como las concentraciones de ANA al medio de cultivo, además se cuantificó el contenido de clorofila mediante el método de N-N-Dimetilformamida y las mediciones SPAD de hojas de diferentes tonalidades de verde. El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro repeticiones. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza complementados con la prueba de Tukey al 5 %. Los resultados mostraron que la corteza de encino, fue el sustrato que favoreció el enraizamiento y supervivencia de las plántulas en la etapa de aclimatación, además se encontró una relación positiva entre contenido de clorofila y las lecturas SPAD, por otra parte se observó que la supervivencia de las plántulas a las condiciones *ex vitro* estuvo influenciada por la intensidad de color de los explantes. .

Palabras clave: *Laelia halbingeriana*, Marcadores moleculares, cromosomas, micropropagación, aclimatación.

GENERAL ABSTRACT

Laelia halbingeriana belongs to the family *Orchidaceae* and because of its relatively new discovery, it has not been characterized morphologically, chromosomically nor molecularly. With the aim of knowing the diversity of this species and its possible relationship with *L. anceps*, *L. superbiens* and *L. autumnalis*, for the molecular characterization through the analysis of RAPDs, 16 primers were used. Four of them showed acceptable amplification products. It was observed 60.97 % polymorphism, which denotes a great variability among the species of *Laelia*. On the other hand, it was observed that the most common chromosomic number is $2n=36$. Moreover, in a third study, a methodology was developed for the *in vitro* propagation of *L. halbingeriana* in which the medium MS (1962) was used, supplemented with 6-benziladenine (BA) (0.0, 2.22 and 4.43 $\mu\text{M}\cdot\text{liter}^{-1}$) and 3-naftalenacetic acid (ANA) (0.0, 2.60, 5.20 and 10.40 $\mu\text{M}\cdot\text{liter}^{-1}$). With these media, seedlings of 2.5 cm were cultured with three saccharose concentrations (58.43, 87.64 and 116.85 $\text{mM}\cdot\text{liter}^{-1}$) and five of mineral salts of the medium MS (50, 75, 100, 125 and 150 %). For the rooting, the seedlings were cultured in the medium MS supplemented with five concentrations of ANA (0.0, 2.60, 7.80, 10.40 and 13.00 $\mu\text{M}\cdot\text{liter}^{-1}$) and five of 3-indolbutiric acid (AIB) (0.0, 4.92, 7.38, 9.84 and 12.30 $\mu\text{M}\cdot\text{liter}^{-1}$). A completely random experimental design was used with factorial array and ten repetitions. At the stage of multiplication, the BA (2.22 $\mu\text{M}\cdot\text{liter}^{-1}$) increased the average number of leaves per plant (3.93), while the largest length (1.11 cm) was achieved by adding ANA (5.20 $\mu\text{M}\cdot\text{liter}^{-1}$). Sugar and mineral salts concentration did not influence in the *in vitro* organogenesis of *L. halbingeriana*. During rooting, the largest number of roots per plant (2.62) was obtained by reducing the mineral salts to 75 %. Addition of 7.80 $\mu\text{M}\cdot\text{liter}^{-1}$ of ANA increased the

number of roots (2.86). Seedlings coming from the tissue culture were grown in plastic trays in greenhouse conditions. Substrates used were oak crust and peat moss, with and without rooter. The growth and development of seedlings *in vitro* and *in vivo* was compared. After 8 months of the starting of the experiment, the evaluated variables were: Height of the plant, number and length of leaves and number and length of roots. Reflectance of leaves was influenced by the contents of mineral salts as well as the concentration of ANA to the culture medium. Besides, the chlorophyll contents was quantified through the method N-N-Dimethylformamide and the SPAD readings of leaves with different shades of Green. The experimental design was completely random with four repetitions. Data was subject to a variance analysis complemented by the Tukey test at 5%. Results showed that the oak crust was the substrate that favored the rooting and survival of seedlings at the acclimatization stage. Moreover, a positive relationship was found between the chlorophyll contents and the SPAD readings. On the other hand, it was observed that the survival of seedlings to the *ex vitro* conditions was influenced by the intensity of the color of the explants.

Keywords: *Laelia halbingeriana*, Molecular markers, chromosomae, micropropagation, acclimation.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT), por el apoyo otorgado para realizar mis estudios de doctorado.

Al Colegio de Postgraduados, por la oportunidad de realizar mis estudios en esta Institución.

A la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” por las facilidades otorgadas para la realización de mi trabajo.

Al Dr. Guillermo Carrillo Castañeda, por su asesoría brindada durante mis estudios doctorales.

A la Dra. Martha Elena Pedraza Santos, por el esfuerzo, tiempo y dedicación para las mejoras de este trabajo.

Al Dr. Tarsicio Corona Torres, por sus sugerencias para la mejora de mi trabajo.

Al Dr. José Alfredo Carrillo Salazar, por sus observaciones y correcciones del trabajo.

Al Dr. Ernesto Gabriel Alcantar González, por el apoyo brindado durante mis estudios.

DEDICATORIAS

A los dinamos de mi vida Derek Yotzoalith y Patricio Elí, porque cada paso que doy es por ustedes.

A Patricio, mi compañero de vida, por tu tiempo, paciencia y cariño.

A mis padres Alfredo Raya López y Delia E. Montaña Mendoza, por su apoyo incondicional para la realización de todas mis metas.

A mis hermanos Alfredo, Carmen y Khépani, por estar siempre apoyándome.

A la Sra. Irene y familia les agradezco su cariño y confianza.

A Uli, por su compañía y apoyo durante mi estancia en Texcoco

A mis amigos que desde lejos comparten las alegrías y tristezas.

CONTENIDO

RESUMEN GENERAL.....	ii
ABSTRACT.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	vi
DEDICATORIAS.....	vii
INDICE CUADROS.....	x
INDICE FIGURAS.....	xii
INTRODUCCION GENERAL.....	1
LITERATURA CITADA.....	4
CAPITULO I. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>Laelia halbingeriana</i>.....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
Material vegetal.....	11
Método combinado de extracción de ADN.....	11
Calidad del ADN.....	11
Condiciones de PCR para generar RAPD.....	12
Separación por electroforesis y visualización de los productos amplificados.....	15
RESULTADOS.....	18
Análisis molecular.....	18
Extracción, cuantificación y calidad de ADN.....	18
Análisis de Marcadores Moleculares amplificados por PCR.....	19
Comparación entre las especies de <i>Laelia</i> con perfiles de RAPD.....	21
DISCUSIÓN.....	26
CONCLUSIONES.....	27
LITERATURA CITADA.....	28
CAPITULO II. NÚMERO CROMOSÓMICO DE <i>Laelia halbingeriana</i>....	30
RESUMEN.....	31
ABSTRACT.....	32
INTRODUCCIÓN.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
Material vegetal.....	34
Reactivos.....	34
Determinación del número cromosómico.....	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
Número cromosómico.....	36
CONCLUSION.....	39
LITERATURA CITADA.....	40
CAPITULO III. PROPAGACIÓN <i>in vitro</i> DE <i>Laelia halbingeriana</i>.....	41
RESUMEN.....	42

ABSTRACT.....	43
INTRODUCCIÓN.....	44
MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
Multiplicación de plántulas.....	46
Medios de cultivo.....	46
Variables evaluadas y análisis estadístico.....	48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
Efecto del tipo y concentración de fitohormonas en la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de plántulas de <i>L. halbingeriana</i>	50
Efecto de la concentración de sacarosa y sales minerales en la propagación de plántulas de <i>L. halbingeriana</i>	54
Efecto de la fuente y concentración de auxina en la rizogénesis <i>in vitro</i> de <i>L. halbingeriana</i>	59
CONCLUSIONES.....	63
LITERATURA CITADA.....	64
CAPITULO IV. Determinación de clorofila durante la aclimatación de <i>Laelia halbingeriana</i>	67
RESUMEN.....	68
ABSTRACT.....	69
INTRODUCCIÓN.....	70
MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
Material vegetativo.....	73
Preparación de las plántulas.....	73
Variables evaluadas.....	73
Captura de imágenes digitales.....	74
Espacios de color.....	74
Determinación de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> y total con N, N-Dimetilformamida y SPAD....	75
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	76
Imágenes digitales.....	79
Determinación de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> y total.....	83
CONCLUSIONES.....	86
LITERATURA CITADA.....	87
DISCUSIÓN GENERAL.....	90
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>Laelia halbingeriana</i>	90
NÚMERO CROMOSÓMICO DE <i>Laelia halbingeriana</i>	92
PROPAGACIÓN <i>in vitro</i> de <i>Laelia halbingeriana</i>	93
DETERMINACIÓN DE CLOROFILA DURANTE LA ACLIMATACIÓN DE <i>Laelia halbingeriana</i>	94

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Condiciones de la mezcla de reacción para obtener RAPD en las especies de <i>L. halbingeriana</i> , <i>L. anceps</i> , <i>L. superbiens</i> y <i>L. autumnalis</i>	14
Cuadro 2. Condiciones de termociclaje para amplificar RAPD obtenidos de <i>L. halbingeriana</i> , <i>L. anceps</i> , <i>L. superbiens</i> y <i>L. autumnalis</i>	15
Cuadro 3. Iniciadores polimórficos elegidos para realizar el análisis de las especies de <i>Laelia</i> y porcentaje de polimorfismo detectado por medio de los RAPD.....	22
Cuadro 1. Composición química de los medios de cultivo. Los medios contenían la concentración de sales minerales del medio de cultivo MS al 100 % y 87.64 mM de sacarosa.....	47
Cuadro 2. Composición química de los medios de cultivo. Los 15 medios contenían 2.22 µM de BA y 5.20 µM de ANA así como la concentración de sales del medio MS y las cantidades de sacarosa indicadas.	48
Cuadro 3. Composición de una serie de 25 medios que contenían la concentración 100 % de sales minerales MS y 87.64 mM de sacarosa. Los medios contenían las cantidades de ANA y AIB indicadas.....	49
Cuadro 4. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la organogénesis <i>in vitro</i> de <i>Laelia halbingeriana</i> a los 60 días de incubación.....	54
Cuadro 5. Efecto de la concentración de sales minerales MS sobre la organogénesis <i>in vitro</i> de <i>L. halbingeriana</i> los 60 días de incubación.....	56
Cuadro 1. Efecto del sustrato en el número y longitud de hojas, número y longitud de raíces y longitud del explante.....	76
Cuadro 2. Efecto del enraizador en el número y longitud de hojas, número y longitud de raíces y longitud del explante.....	77
Cuadro 3. Efecto de la interacción entre el sustrato y el enraizador en el número y longitud de hojas, número y longitud de raíces y longitud del explante.....	78

Cuadro 4. Efecto de la concentración de sales minerales del medio de cultivo en la reflectancia de las hojas de <i>L. halbingeriana</i> propagadas <i>in vitro</i>	80
Cuadro 5. Efecto de la concentración de azúcar en el medio de cultivo en la reflectancia de las hojas de <i>L. halbingeriana</i> propagadas <i>in vitro</i>	81
Cuadro 6. Efecto de la concentración de ANA en el medio de cultivo en la reflectancia de las hojas de <i>L. halbingeriana</i> propagadas <i>in vitro</i>	82
Cuadro 7. Efecto de la concentración de AIB en el medio de cultivo en la reflectancia de las hojas de <i>L. halbingeriana</i> propagadas <i>in vitro</i>	83

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Visualización del tamaño de las bandas en pb que proporciona el marcador de peso molecular 1 Kb (Kilobase) Ladder, Invitrogen®. (0.7 µg/carril, en un gel de 0.9% agarosa, teñido con bromuro de etidio).....	16
Figura 2. Gel de agarosa 1 % que muestra los perfiles de ADN de <i>L. halbingeriana</i> , <i>L. anceps</i> , <i>L. superbiens</i> y <i>L. autumnalis</i>	19
Figura 3. Gel de agarosa (1.5%), que muestra los patrones polimórficos de ADN amplificado al azar (RAPD), generados por los iniciadores aleatorios OPA 8, OPA 12, OPA 15 Y OPA 18 usado en especies de <i>L. halbingeriana</i> , <i>L. anceps</i> , <i>L. superbiens</i> y <i>L. autumnalis</i>	20
Figura 4. Gel de agarosa (1.5%) que muestra los patrones polimórficos de ADN amplificado al azar (RAPD), generadas por el iniciador aleatorio OPA 15, evaluado de <i>L. halbingeriana</i> , <i>L. anceps</i> , <i>L. superbiens</i> y <i>L. autumnalis</i>	21
Figura 5. Iniciador Diferentes grados de polimorfismo en patrones de productos de amplificación en los géneros estudiados: A: iniciador A10, B: Iniciador A 15; C: Iniciador B12 y D: Iniciador B18.....	23
Figura 6. Dendograma generado de la matriz de similaridad promedio, una vez realizados los remuestreos para las especies de <i>Laelia</i>	24
Figura 1. Cromosomas de <i>L. halbingeriana</i> en metafase.....	36
Figura 1. Efecto de la concentración de BA (A y C) y concentración de ANA (B y D) en el número y longitud de las hojas formadas <i>in vitro</i> de <i>L. halbingeriana</i> en un periodo de cultivo de 60 días.....	51
Figura 2.Efecto de la concentración de BA (A) y ANA (B) en la altura de plantas formadas <i>in vitro</i> de <i>L. halbingeriana</i> en un periodo de 60 días.....	52
Figura 3.Efecto de la concentración de BA (A y C) y de ANA (B y D) sobre el número y longitud de las raíces formadas <i>in vitro</i> de <i>L. halbingeriana</i> a los 60 días de incubación.....	53

Figura 4. Número de hojas (A), longitud de hojas (cm) (B), altura de planta (C) desarrollados <i>in vitro</i> de <i>Laelia halbingeriana</i> en un periodo de 60 días.....	58
Figura 5. Influencia de la concentración de ANA (A y C) y concentración de AIB (B y D) sobre el número y longitud de las raíces formadas <i>in vitro</i> de <i>L. halbingeriana</i> a los 60 días de incubación.....	59
Figura 6. Influencia de la concentración de ANA (A y C) y concentración de AIB (B y D) en el número y longitud de hojas formadas <i>in vitro</i> de <i>L. halbingeriana</i> a los 60 días de incubación.....	61
Figura 7. Efecto de la concentración de ANA (A) y de AIB (B) en la altura de plantas formadas de <i>L. halbingeriana in vitro</i> a los 60 días de incubación.....	62
Figura 1. Correlación entre clorofila a extractable y unidades SPAD en plántulas de <i>L. halbingeriana</i>	84
Figura 2. Correlación entre clorofila b extractable y unidades SPAD en plántulas de <i>L. halbingeriana</i>	84
Figura 3. Correlación entre clorofila total extractable y unidades SPAD en plántulas de <i>L. halbingeriana</i>	85

INTRODUCCIÓN GENERAL

La familia *Orchidaceae* es considerada como la más grande de las plantas con flores ya que tiene alrededor de 30 000 especies (Storm, 2006). En México se estiman entre 1106 a 1400 especies y subespecies, la mayor diversidad en el trópico de cáncer (Hángster *et al.*, 2005); los estados de la República Mexicana con más especies son Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Guerrero, Morelos, Jalisco, Michoacán, Quintana Roo, Puebla, Nayarit, Tlaxcala y San Luis Potosí (Tellez *et al.*, 2005; Hángster *et al.*, 2005). Entre las características más interesantes de esta familia es su alto grado de endemismo en México se han registrado 444 especies que corresponden al 40 % del total de taxa en el país (Espejo *et al.*, 2002). Sin embargo, la alteración y destrucción de su hábitat, la extracción ilegal entre otros factores hacen que varias especies de orquídeas mexicanas estén consideradas en peligro de extinción (SEMARNAT, 2010).

En México las investigaciones en orquídeas se han enfocado a la propagación y a la caracterización morfológica (Castillo y Engleman, 1993) y en menor proporción de estudios de caracterización molecular. Estos estudios son herramientas para el análisis filogenético y taxonómico de orquídeas mexicanas, mapeo de genomas, cuantificación de variabilidad génica intra e interespecifica, mejora genética, entre otros. Además de que con esta técnica se ha logrado corregir errores de identificación (Przeslawski, 1995).

Los métodos más utilizados para definir la posición taxonómica se basan en caracteres morfológicos, sin embargo debido a la gran variación genética de las orquídeas hace casi imposible definir su posición taxonómica por medio de ellos. Los marcadores moleculares pueden identificar características específicas de cada especie, y se puede

definir la relación existente entre cada una, sin estar influenciados por el ambiente, la edad de la planta, entre otros.

Los marcadores de tipo RAPD se han aplicado en diversos estudios para orquídeas. En vainilla los RAPD y AFLP han servido para caracterización de híbridos y su progenie (Divakaran *et al.*, 2006; 2008). Además de que han servido para definir la variación genética entre especies de orquídeas (Sun y Wong 2001). Además de que estos estudios permiten desarrollar estrategias de conservación genética y el manejo de las especies.

A pesar del gran número de especies existentes de orquídeas, se cuenta con muy pocos estudios a nivel molecular y citogenéticos, debido a que se enfocan principalmente en especies comerciales y se estima que solo 10 % de las especies de esta familia han sido analizadas cromosómicamente (Daviña *et al.*, 2009).

Aunado a lo anterior el lento desarrollo de las orquídeas y poca sobrevivencia de plántulas, ha provocado un decremento considerable en la población. Tradicionalmente las orquídeas se han propagado asexualmente mediante división de plantas; sin embargo, se ha demostrado que la propagación *in vitro* es una técnica viable en la germinación de semillas (Arditti, 1993). Además de que se obtiene un gran número de plantas se reduce el tiempo de multiplicación, se controla la sanidad del cultivo y existe la posibilidad de multiplicar rápidamente una especie de la cual existan pocos individuos.

La propagación *in vitro* requiere de un proceso de adaptación de las plántulas al medio conocida como aclimatación y es considerada como etapa crítica ya que las orquídeas bajo condiciones *in vitro*, se encuentran con intensidad de luz y temperatura constantes, en medios de cultivo con nutrimentos controlados y una fuente de azúcar, además de baja concentración de CO₂, lo cual hace que las plántulas se desarrollen en

ambiente heterótrofo lo que limita a las plantas a realizar sus funciones, además la alta humedad relativa provoca la incapacidad de las plantas de controlar la transpiración

Se han diseñado diferentes enfoques para lograr con éxito la aclimatación de las plántulas micropropagadas, además de diferentes medios de cultivo, así como el contenido de sales minerales, la concentración de agar y sacarosa en el medio, ya que tiene efecto en el desarrollo de la planta *ex vitro* (Deb y Imchen 2010). Además, se han utilizado sustratos alternativos (Deb y Imchen 2010) y sistemas hidropónicos (Lopes da Silva, 2006) para lograr mayor porcentaje de éxito durante la aclimatación.

Laelia halbingeriana (familia *Orchidaceae*), no es la excepción a lo anterior, sin embargo, los pocos estudios que se han realizado en esta especie han sido con el fin de asegurar su supervivencia, por lo que para este trabajo se plantean los siguientes objetivos: Caracterizar molecularmente a *L. halbingeriana* mediante RAPDs y determinar el número cromosómico de *L. halbingeriana*; establecer un método práctico y competitivo para propagar *in vitro* *L. halbingeriana*; evaluar la eficiencia de sustratos de origen vegetal y el uso de enraizador en explantes la influencia del color del explante y el contenido de clorofila durante la etapa de aclimatación de *L. halbingeriana*.

LITERATURA CITADA

- Arditti, J. R. E (1993) Micropropagation of orchids. John Wiley and Son, New York pp 413-426.
- Castillo, R. y Engleman, E.M. 1993. Caracterización de dos tipos de *Vanilla planifolia*.
Acta Botánica Mexicana 25: 49-59.
- Daviña J. R: Grabile. M, Cerutti. J.C.; Hojsgaard, D.H.; Almada, R.D. 2009. In saurral de IS, Honfi AI. Chromosom studies in Orchidaceae from Argentina. *Genetics and Molecular Biology* 32: 811–821.
- Deb, C.R.; Imchen, T. 2010. An efficient In vitro hardening technique of tissue culture raised plantas. *Biotechnol.*1-5.
- Divakaran, M., Babu, K.N., and Peter, K.V. (2006). Conservation of *Vanilla* species, in vitro . *Scientia horticultrae* 110: 175-180. Divakaran, M., Pillai, G.S., Babu, K.N., and Peter, K.V. (2008). Isolation and fusion of protoplasts in *Vanilla* species. *Current Science* 94(1): 115-120.
- Espejo, A. García, C. J.; López, A.R.; Jiménez, M.R., Sánchez, S. L. 2002 Orquídeas del estado de Morelos. Herbario AMO. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, D. F. México 16: 1-392.
- Hágsater, E.; Soto, A. M. A.; Salazar, C. G. A; Jiménez, M. M. A.; López, R. Y. y Dressler, R. L. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín. México. 304 p.
- López da Silva, A.L.; Henz, FET.; HOrbach, M.A.; Walter, J.M. 2006. Aclimatização de mudas de *Cattleyatigrina* A. Rich. Ex Beer (orchidaceae) em sistema hidropónico. *Cuaderno de Pesquisa SérBio* 18:129-139.
- Przeslawski, J. 1995. Mark Chase and the Molecular Systematics Story. *American Orchid Society Bulletin*, 64(6): pp. 629 – 635.

SEMARNAT (2011) Norma oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010 Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. In: Lista de especies en riesgo. Instituto Nacional de Ecología. Disponible en: DIALOG. http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/normas/rec_nat/no_59.html Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Consultado el 25 de enero de 2011.

Storm, R. 2006 Orchids Plants. Orchids are the favorites of horticulturists. <http://www.content-articles.com/articles/47635/1/Article-By-Robin-Storms-Orchids-PlantsBRBROrchids-are-the-favorites-of-horticultu/page1.html>. Última consulta 04/05/13

Sun, M.; Wong, K.C. 2001. Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. *Am. J. Bot.* 88: 2180 – 2188.

Téllez, V. M. A. 2005. La orquídea, flor cumbre de la evolución. *Revista del Instituto Politécnico Nacional* 38: 11-21.

CAPITULO I. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Laelia halbingeriana*

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Laelia halbingeriana*

RESUMEN

Laelia halbingeriana pertenece a la familia *Orchidaceae* y debido a su descubrimiento relativamente reciente, no se ha caracterizado morfológica ni molecularmente, con la finalidad de conocer la diversidad de este género y su posible relación con otras especies. El objetivo de este trabajo fue caracterizar las especies del género *L. halbingeriana*, *L. anceps*, *L. superbiens* y *L. autumnalis* mediante el análisis de RAPDs. Los materiales provenían del laboratorio de cultivo de genética molecular del Colegio de Postgraduados campus Montecillos.

Para la obtención de los patrones RAPDs se utilizaron 16 iniciadores y las reacciones de PCR se realizaron con el programa: un ciclo a 94 °C (1 min); 38 ciclos (30 seg a 94 °C, 30 seg a 35 °C y 1 min a 72 °C) y un ciclo final a 72 °C tres minutos. El ADN genómico presentó buena calidad y 4 de los iniciadores mostraron productos de amplificación aceptable. Los resultados mostraron 60.97 % de polimorfismo que denota gran variabilidad entre las especies de *Laelia*.

Palabras clave: *Laelia* spp, orquídeas, RAPD, marcadores moleculares.

ABSTRACT

Laelia halbingeriana belongs to the family of *Orchidaceae* and because of its relatively new discovery, it has not been characterized neither morphologically nor molecularly with the aim of knowing the diversity of this genre and its possible relationship with other species. The goal of this work is to characterize the species of the genre *L. halbingeriana*, *L. anceps*, *L. superbiens* and *L. autumnalis* through a RAPDs analysis. Materials came from the laboratory of molecular genetics culture of Colegio de Postgraduados Campos Montecillos.

To obtain the RAPDs patterns, 16 boosters were used and the PCR reactions were performed under the program: one cycle at 94 °C (1 min); 38 cycles (30 seg at 94 °C, 30 seg at 35 °C and 1 min at 72 °C) and a final cycle at 72 °C three minutes. Genomic DNA showed good quality and 4 of the boosters showed acceptable products of amplification. Results showed 60.97% of polymorphism that confirms a great variability of the species of *Laelia*.

Keywords: *Laelia* spp, orchideae, RAPD, molecular markers.

INTRODUCCION

Laelia halbingeriana de la familia *Orchidaceae* es una especie de crecimiento epifito endémica del valle húmedo de encino, en una cañada de la reserva de la Biosfera Tehuacan-Cuicatlán en Oaxaca. El color de los pétalos de la flor es rosa o magenta con líneas púrpuras y en el centro resalta un color amarillo, contraste de colores que le da mayor tonalidad y atracción. Sus pétalos son ondeados e irregulares. Esta especie, recientemente se definió como un nuevo taxón (Hángsater *et al.*, 2005) que es amenazado principalmente por la reducción de su hábitat natural debido a la deforestación, y a la extracción ilegal de plantas. *L. halbingeriana* se encuentra en proceso de descripción formal; es similar a *L. superbiens* de Chiapas y Centroamérica, pero presenta varias diferencias morfológicas significativas. Mediante el uso de marcadores moleculares se puede obtener información acerca de su relación con otras especies y su ubicación taxonómica (Rosas, 2001) además, el polimorfismo detectado en el ADN puede ser usado para la identificación de especies y de sus híbridos. Las diferencias a nivel morfológico, bioquímico y molecular; sin embargo, son clave para la caracterización de esta especie, por ello la utilización de ADN son la mejor alternativa. Los marcadores moleculares basados en el ADN, a diferencia de los demás marcadores moleculares, no son afectados considerablemente por el ambiente y no varían con la edad de la planta. Pueden ser regiones codificantes, aunque la mayoría de los polimorfismos ocurren en regiones no codificantes.

Entre las primeras técnicas moleculares generadas utilizando PCR, se encuentra el uso de marcadores de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) que únicamente utiliza un cebador pequeño de entre 6 a 10 pares de bases (pb), de secuencia arbitraria con

50 – 80 % del par guanina – citocina. Debido al tamaño de estas secuencias se tienen ciertas posibilidades de encontrar varios sitios complementarios en el genoma en estudio, originando la amplificación simultánea de varios fragmentos. La eficiencia de la amplificación de los fragmentos de ADN, depende de la concentración y secuencia de bases en el ADN molde, de la longitud del cebador, y de la temperatura de acoplamiento (Castro *et al.*, 2001).

Los marcadores tipo RAPD ya han sido aplicados en diversos estudios para orquídeas. Limet *al.* (1999), los utilizaron para analizar especies del género *Vanda* (Orquidácea) para determinar la cercanía genética de varias especies. Chung *et al.* (1996), en su estudio de orquídeas los emplearon para detectar el virus *cymbidium* del mosaico. Chan y Sun (1995), investigaron las especies *Spiranthes sinensis* y *S. hongkongensis*, para definir su diversidad genética. También, Chan y Sun (1997), usaron ADN de cloroplasto para analizar los patrones de especiación en el individuo. El objetivo de esta investigación fue caracterizar molecularmente a *L. halbingeriana* mediante el análisis de RAPDs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Plantas de *L. halbingeriana*, *L. anceps*, *L. superbiens* y *L. autumnalis* fueron proporcionadas por el laboratorio de genética molecular del Colegio de Postgraduados campus Montecillos.

Método combinado de extracción de ADN

Para la extracción de ADN a partir de tejido foliar fresco (0.3 g) se utilizó el método combinado MLO de Lee *et al.* (1991) y CTAB 3% (Ahrens y Seemüller, 1992) modificado por Cazares *et. al.*, (2010). El ADN extraído de cada una de las muestras fue almacenado a -20° C.

Calidad del ADN

La integridad del ADN, se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa (1 %), para lo cual se colocó en cada uno de los pozos la mezcla compuesta de 5 µL de la solución de ADN y 2.0 µL de amortiguador de carga (azul de bromofenol 0.25 %, xileno cianol FF 0.25 % y glicerol al 30 %). El amortiguador de separación del ADN fue TAE 1X (TAE 50X: Tris base 242 g; ácido acético glacial 57.1 mL y EDTA 0.5 M, pH 8.0 100 mL aforado a un litro), la electroforesis se llevó a cabo a 95 Volts durante 30 min y el gel fue teñido con bromuro de etidio (1 µL de Bromuro de etidio [10 mg mL⁻¹] por cada 100 mL de gel de agarosa).

El ADN fue visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta Modelo Gel-Doc 2000, BIO RAD[®] y analizado con el programa Quantity One 4.0.3, incluido en el equipo.

La imagen que se obtuvo reflejó bandas uniformes e íntegras de ADN a 12000 pb, aproximadamente. Después se procedió a diluir 1:20 del ADN con agua inyectable estéril. Se obtuvo una concentración final aproximada de 20 ng μL^{-1} de ADN en cada una de las especies.

Condiciones de PCR para generar RAPD

Iniciadores para RAPD

Diferentes pruebas de estandarización fueron realizadas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para RAPD con 16 iniciadores decámeros de secuencia aleatoria de la serie A de Operon (01, 02, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 12, 13, 15, 16, 17 y 19) y de la serie B (B12 y B18); estos iniciadores fueron sintetizados por el Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México (UNAM). Después de la estandarización se seleccionaron cuatro iniciadores (OPA: A10, A15, B12 y B18) para su uso en RAPD, estos cuatro iniciadores presentaron el mejor polimorfismo y marcaron diferencias considerables en el bandeo, con respecto a los 12 que no se seleccionaron.

La secuencia de estos iniciadores seleccionados se presenta a continuación:

A 10 Secuencia (5'→3'): GTG ATC GCA G

A 15 Secuencia (5'→3'): TTC CGA ACC C

B 12 Secuencia (5'→3'): CTT TGA CGC A

B 18 Secuencia (5'→3'): CCA CAG CAG T

Para lograr la amplificación de ADN de *L. halbingeriana*, *L. anceps*, *L. superbiens* y *L. autumnalis* en PCR, los reactivos se fusionaron en una mezcla de reacción con un volumen final de 25µL de mezcla por tubo de PCR de acuerdo con el cuadro 1.

Cuadro 1. Condiciones de la mezcla de reacción para obtener RAPD en las especies de *L. halbingeriana*, *L. anceps*, *L. superbiens* y *L. autumnalis*

Reactivo	Volumen de reactivos	Concentración final
	<i>In vitro</i> (μL)	de los reactivos
Amortiguador de reacción	2.5	1 X
MgCl ₂ (Cloruro de magnesio)	3.0	3.0 mM μL ⁻¹
dNTP's	0.5	2.5 mM μL ⁻¹
Iniciador aleatorio	2.0	10.0 pmol μL ⁻¹
ADN polimerasa (Amplificasa [®])	0.3	1.5 U μL ⁻¹
ADN genómico de <i>Laelia</i>	5.0	100 ng μL ⁻¹
Agua	11.7	--
Volumen final	25	--

Para la amplificación mediante PCR se utilizó un termociclador BIO RAD[®], serie 582BR. Las condiciones de termociclado para las técnicas empleadas se expresan en el Cuadro 2

Los productos de amplificación obtenidos a partir de los RAPD fueron almacenados para su separación posterior por medio de electroforesis a -20° C.

Cuadro 2. Condiciones de termociclaje para amplificar RAPD obtenidos de *L. halbingeriana*, *L. anceps*, *L. superbiens* y *L. autumnalis*.

Ciclos	Temperatura	Tiempo
RAPD		
1	94° C	1'
	94° C	30''
38	35° C	30''
	72° C	1'00''
	72° C	3'00''
1	4° C	A

Separación por electroforesis y visualización de los productos amplificados

En cada uno de los pozos del gel (1.5 % de agarosa) se colocó una mezcla compuesta de 10 µL de producto de reacción y 2.0 µL de buffer de carga azul. El buffer de separación del ADN utilizado fue TAE 1X. Un pozo se incluyó con 0.7 µL de marcador de peso molecular 1 Kb (1 Kb Ladder, Invitrogen[®], Figura 1) como referencia. La separación se llevó a cabo a 90 Volts durante 1 hora. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron bajo luz ultravioleta en un foto-documentador (Modelo Gel Doc 2000, BIO RAD[®]), la foto del gel se tomó con el programa QuantityOne 4.0.3, incluido en el equipo de foto-documentación. Los resultados se imprimieron en papel fotográfico para su posterior análisis.

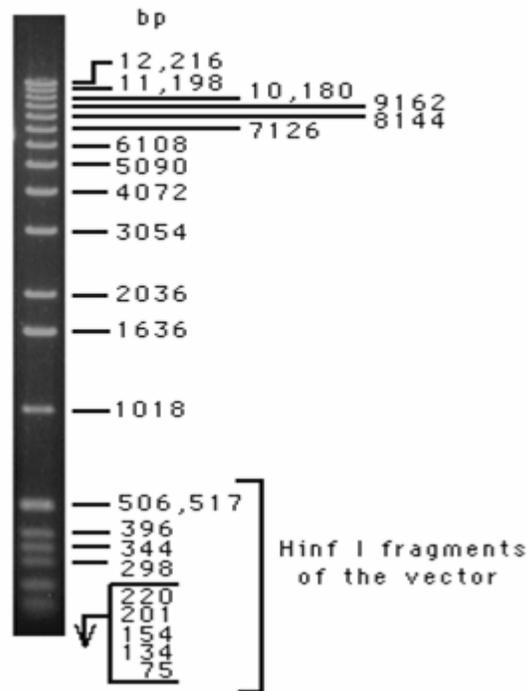


Figura 1. Visualización del tamaño de las bandas en pb que proporciona el marcador de peso molecular 1 Kb (Kilobase) Ladder, Invitrogen®. (0.7 µg/carril, en un gel de 0.9% agarosa, teñido con bromuro de etidio).

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se utilizó el paquete computacional de NTSYS-pc versión 2.2R (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System). Las bandas obtenidas con cada uno de los iniciadores usados se enumeraron en orden descendente a partir de la banda de mayor peso molecular (la más cercana al origen) y se codificaron mediante el código binario, asignando un valor numérico: uno para denotar la presencia de la banda y cero para indicar la ausencia de banda, conformando entonces una matriz básica de datos o matriz binaria que fue empleada para generar la matriz de disimilitud genética mediante el coeficiente de DICE (1945) o NeiLi (1979), que es una medida de similitud genética, que se refiere a la comparación de

un par de patrones de bandeo de dos individuos, y se obtiene del doble del número de bandas compartidas sobre el total de bandas en ambos individuos) para de esta forma calcular la frecuencia de aparición de cada banda registrada.

Los dendrogramas de agrupación de las especies de orquídea, fueron derivados de la matriz de disimilitud con el programa SAHN (Sequential Agglomerative Hierarchical NestedCluster Analysis), Dunn and Everitt (1982), del sistema de análisis multivariado y taxonómico numérico (NTSYS-pc 2.2R), por medio del método del promedio aritmético no ponderado por pares entre agrupamientos, tipo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic Averages) (Adams *et al.*, 2000).

La confiabilidad del dendrograma se probó mediante el método de remuestreo en las matrices de datos con Bootstrapping con un $\alpha=0.05$, en el módulo “*Transformation/Resample*” y “*Transformation/Summary*” con 2000 remuestreos y por medio de una matriz de comparación entre la matriz de similitud generada de la matriz básica de datos y de una matriz promedio generada con el remuestreo con Bootstrap, realizada con el modulo “*Graphics/Matrixcomp. Plot*”, todo con el paquete de NTSYS-pc 2.2R.

RESULTADOS

Análisis molecular

Extracción, cuantificación y calidad de ADN

En la extracción de ADN de *L. halbingeriana*, *L. anceps*, *L. superbiens* y *L. autumnalis* fue posible obtener fragmentos de ADN de buena calidad, adecuadas para la realización de las metodologías del presente trabajo.

La evaluación cualitativa se realizó en gel de agarosa al 1 %, observando una banda uniforme y bien definida de aproximadamente 12 000 pb que demuestra el grado de integridad del ADN extraído, por lo que en la Figura 2, se muestran algunos de los resultados de la extracción.

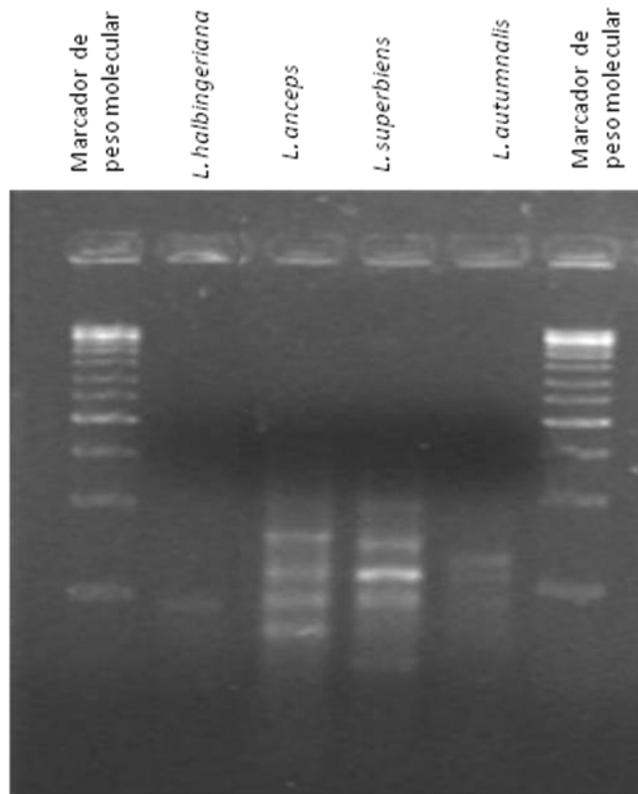


Figura 2. Gel de agarosa 1 % que muestra los perfiles de ADN de *L. halbingeriana*, *L. anceps*, *L. superbiens* y *L. autumnalis*

Análisis de Marcadores Moleculares amplificados por PCR

Los análisis de los marcadores moleculares se basaron en el uso de la técnica de PCR: RAPD y en las amplificaciones realizadas se apreció que algunos de los iniciadores utilizados no amplificaron el ADN de todas las especies, en estudio. Esto pudo deberse a que las secuencias de los iniciadores no reconocieron ningún sitio blanco en el genoma de estas variedades (Figura 3).

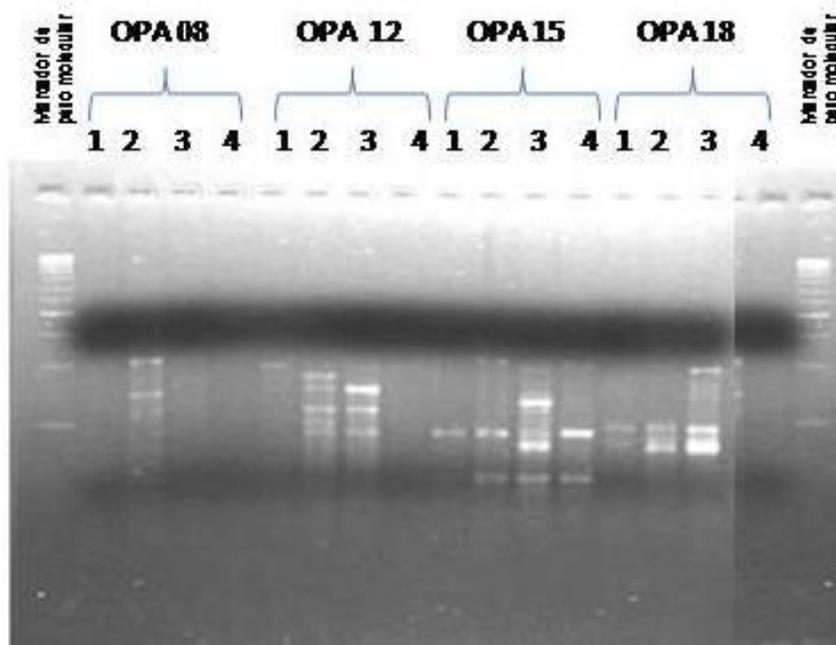


Figura 3. Gel de agarosa (1.5%), que muestra los patrones polimórficos de ADN amplificado al azar (RAPD), generados por los iniciadores aleatorios OPA 8, OPA 12, OPA 15 Y OPA 18 usado en especies de *L. halbingeriana*, *L. anceps*, *L. superbiens* y *L. autumnalis*

En algunos de los iniciadores utilizados en la técnica, por ejemplo; el caso del iniciador OPA 15 (Figura 4), utilizado en RAPD se pudieron apreciar bandas polimórficas distintivas entre especies, es decir a simple vista en el gel, se pudieron observar las agrupaciones de las especies.

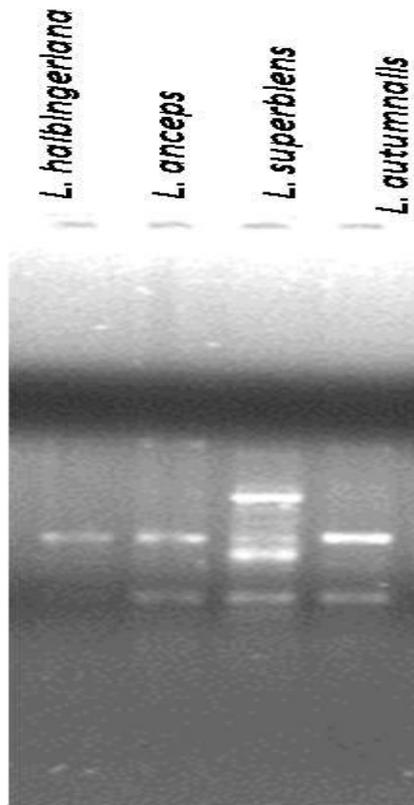


Figura 4. Gel de agarosa (1.5%) que muestra los patrones polimórficos de ADN amplificado al azar (RAPD), generadas por el iniciador aleatorio OPA 15, evaluado de *L. halbingeriana*, *L. anceps*, *L. superbiens* y *L. autumnalis*

Comparación entre las especies de *Laelia* con perfiles de RAPD

En cada uno de los perfiles de electroforesis se logró observar una separación bien definida de las bandas generadas con cada uno de los iniciadores aleatorios (OPA 10, OPA 15, OPA 12 y OPA 18) en las especies de *Laelia*.

Con los cuatro iniciadores aleatorios utilizados en RAPD se obtuvo un total de 123 bandas, de las cuales 75 fueron polimórficas, lo cual representa un 60.97 % de polimorfismo (Cuadro 3)

Cuadro 3. Iniciadores polimórficos elegidos para realizar el análisis de las especies de *Laelia* y porcentaje de polimorfismo detectado por medio de los RAPD

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Número de bandas	Numero de bandas monomórficas	Número de bandas polimórficas
A 10	GTG ATC GCA G	32	19	13
A15	TTC CGA ACC C	23	4	19
B12	CTT TGA CGC A	33	16	17
B18	CCA CAG CAG T	35	9	26

Proporción de polimorfismo 60.9 %

Con los marcadores utilizados, el número de marcadores por *Iniciador* y el porcentaje de marcadores polimórficos dentro de las especies de *Laelia* evidencian una alta variabilidad intraespecífica (Cuadro 3).

En la figura 5 se muestra el polimorfismo existente en los patrones de amplificación de las especies de *L. halbingeriana*, *L. anceps*, *L. superbiens* y *L. autumnalis*, obtenidos con los iniciadores A10, A15, B12 y B18.

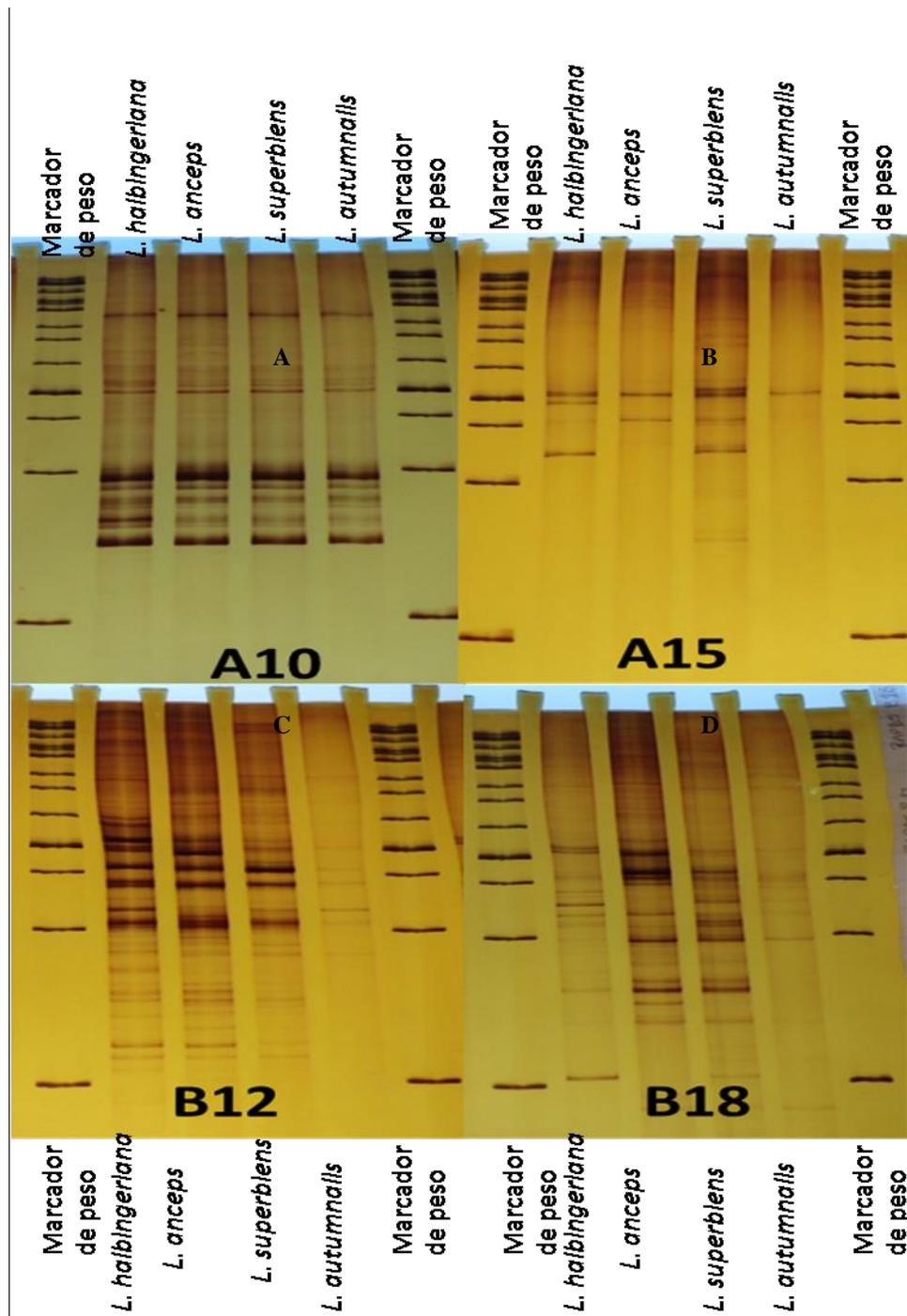


Figura 5. Iniciador Diferentes grados de polimorfismo en patrones de productos de amplificación en los géneros estudiados: A: iniciador A10, B: Iniciador A 15; C: Iniciador B12 y D: Iniciador B18

En la figura 6 se presentan los dendrogramas de las especies de *L. halbingeriana*, *L. anceps*, *L. superbiens* y *L. autumnalis* obtenidos mediante el análisis de los patrones RAPDs. En la figura 6 se observan dos agrupamientos el iniciador lo forman *L. halbingeriana*, *L. anceps* y *L. superbiens* con un coeficiente de similitud de del 91 % el otro grupo lo forma *L. autumnalis*.

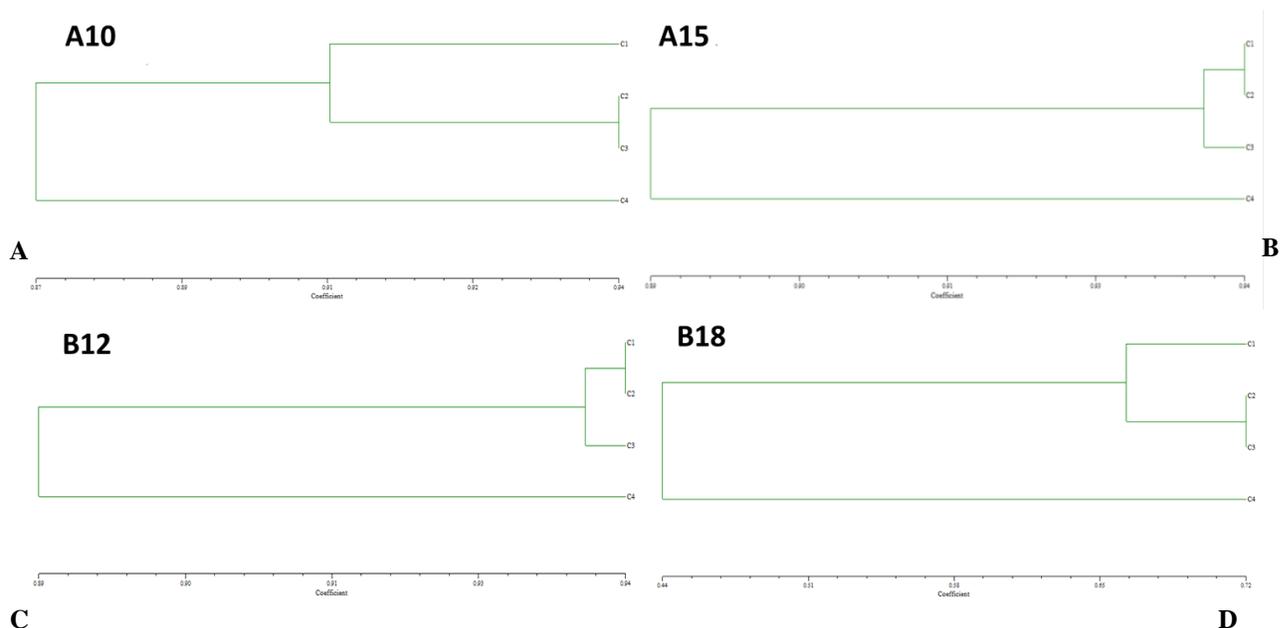


Figura 6. Dendrograma generado de la matriz de similitud promedio, una vez realizados los remuestros para las especies de *Laelia*.

El dendrograma de la figura 6 muestra dos grupos definidos entre los individuos de *L. halbingeriana*, *L. anceps*, *L. superbiens* y *L. autumnalis*, lo que coincide con las características de las especies. En la figura 6 se observa el agrupamiento de los individuos de *L. halbingeriana*, *L. anceps*, *L. superbiens* de forma compacta en un grupo con un coeficiente de similitud de 93.7 % y los individuos de *L. autumnalis* en otro grupo.

El dendrograma de la figura 6 presenta la definición de dos grupos en uno se agrupa claramente *L. halbingeriana*, *L. anceps*, *L. superbiens* con un porcentaje de similitud de 66.7 % y el otro grupo lo forma *L. autumnalis*

Cabe señalar que *L. autumnalis* no mostró ningún tipo de polimorfismo con los cebadores utilizados.

DISCUSIÓN

La familia *Orquidácea* es una de las más extensas en géneros y especies del mundo. Su complejidad para definir límites entre los géneros y especies origina debates entre los científicos que estudian esta familia. Los estudios actuales realizados en esta familia se apoyan en múltiples técnicas, entre ellas la biología molecular. Este estudio demostró que la técnica RAPDs fue útil para evaluar la diversidad genética a nivel intraespecífico. En términos generales con los marcadores RAPDs se evidencia la diversidad genética entre las especies de *Laelia*. Por los agrupamientos obtenidos se observó que *L. halbingeriana*, *L. anceps*, *L. superbiens* están más emparentadas que *L. autumnalis*, lo que coincide con la literatura. Ávila y Oyama (2007), encontraron 76 % de diversidad genética en poblaciones naturales de *L. speciosa*. En otras especies como vainilla los marcadores RAPDs han servido para identificar gran diversidad genética Schlüter *et al.* (2007).

CONCLUSIONES

Los marcadores moleculares permitieron identificar por sus patrones RAPD a cada especie estudiada, las especies presentaron un patrón de bandeo diferente, obteniéndose con ello la huella genética de 3 de las especies de *Laelia*. Se determinó el porcentaje de polimorfismo de la *L. halbingeriana*, *L. anceps*, *L. superbiens* y *L. autumnalis*. Los marcadores moleculares RAPD sirven de herramienta para priorizar las especies de orquídea a ser conservadas con base en su variabilidad genética.

LITERATURA CITADA

Ávila, D. I. and Oyama, K. 2007. Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *Am. J. Botany* 94 (2): 184-193.

Castro, A.; Rosas, J.C.; Aranda L. 2001. Manual del Módulo de Biotecnología. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, 19p.

Cazarez, S. E.; Segura, L. S.; Domínguez, A.J.L.; Luna, M.C.C; Alanís, M. I.; Soto, H. R.M. 2010. Elimination oxidative compounds to increase the quality and quantity of DNA extracted from leaves of guava (*Psidium guajava* L.). *Acta horticulturae* 849: pp. 251-256.

Chan, M.C.; Sun, M. 1995. Application of RAPD markers for evaluation of genetic diversity in *Spiranthes sinensis* and *S. hongkongensis* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 82(6): 71p.

Chan, M.C.; Sun, M. 1997. RAPD and chloroplast DNA evidence for allopolyploid speciation of *Spiranthes hongkongensis* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 84(6):115.

Chung, S.Y.; Yoon, K.E.; Ryu, K.H.; Park, W.M. 1996. Detection of cymbidium mosaic virus from orchids by reverse transcription and polymerase chain reaction

amplification of the viral coat protein and 3'-noncoding region sequence. Journal of the Korean Society for Horticultural Science 37: pp. 158-165.

Hágsater, E.; Soto, A. M. A.; Salazar, C. G.A; Jiménez, M. M.A. López, R. Y Dressler R.L. 2005. 304 p Las orquídeas de México. Instituto Chinoín. México.

Lim, S.H., et al. 1999. RAPD analysis of some species in the Genus *Vanda* (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 83: pp. 193 – 196. Revisado el 8 de octubre en red: aob.oupjournals.org

Rosas, J.C. 2001. Manual del Módulo de Biodiversidad y Fitomejoramiento. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, 59 p.

Schlüter, P. M.; Soto, A. M.; Harris, S. A. 2007. Genetic variation in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Economic Botany* 61 (4) 328:336.

CAPITULO II. NÚMERO CROMOSÓMICO DE *Laelia halbingeriana*

NÚMERO CROMOSÓMICO DE *Laelia halbingeriana*

RESUMEN

Laelia halbingeriana actualmente amenazada por la reducción de su hábitat, pertenece a la familia Orchidaceae y es endémica de la cañada de Oaxaca. Las investigaciones referentes a la caracterización de esta especie son escasas por lo que en esta investigación se trató de identificar su número cromosómico que se desconocía. Ápices de raíces de plántulas obtenidas *in vitro* fueron utilizadas para hacer la preparación de cromosomas que consistió en realizar dos pretratamientos: a) colchicina 0.5% más 8-hidroxiquinoleina 0.002 M a 23 °C y b) 8-hidroxiquinoleina 0.002 M a 4 °C ambos pretratamientos durante 4, 6 y 7 horas. Para las observaciones citológicas se empleó la técnica de tinción con el reactivo de Shiff y para el aplastado orceina propiónica 2 %. Se observó que el número cromosómico más común fue de $2n=36$.

Palabras clave: *Laelia halbingeriana*, cromosoma, endémica, Orquídea

ABSTRACT

Laelia halbingeriana is currently threatened by the reduction of its habitat. It belongs to the family of Orchidaceae and it is endemic of the Oaxaca glen. Previous research's related to the characterization of this species are rare, the reason why in this work the goal was to identify its chromosomic number, previously unknown. Root apices of seedlings obtained in vitro were used to make the chromosomic preparation which consisted in performing two pre-treatments: a) colchicine 0.5% plus 8-hidroxiquinoleina 0.002 M at 23 °C and b) 8-hidroxiquinoleina 0.002 M at 4 °C, both pre-treatments during 4, 6 and 7 hours. For the cytological observation, the staining technique with Schiff reactive was used and for the smashed, propionic orceine 2 %. It was observed that the chromosomic number most commonly found was $2n=36$.

Palabras clave: *Laelia halbingeriana*, chromosom, endemic, Orchidea

INTRODUCCIÓN

Laelia halbingeriana (familia *Orchidaceae*), considerada una especie en vías de caracterización, es una planta epífita endémica de la cañada de Oaxaca, en la reserva de la Biósfera Tehuacán-Cuicatlán. Está amenazada por la reducción de su hábitat debido principalmente a la deforestación, cambios en el uso de suelo y extracción ilegal de plantas (Hángsater *et al.*, 2005) lo que aumenta el riesgo de su desaparición. Se están llevando a cabo algunos estudios con el fin de asegurar su supervivencia. A pesar del gran número de especies existentes de orquídeas, se cuenta con muy pocos estudios citogenéticos, ya que se estima que solo 10 % de las especies de esta familia han sido caracterizadas cromosómicamente (Daviña *et al.*, 2009) y, por lo anterior, el objetivo fue determinar el número cromosómico de *L. halbingeriana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Plántulas de *L. halbingeriana* cultivadas *in vitro* fueron proporcionadas por el Dr. Raymundo Enríquez del Valle provenientes del Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto Tecnológico Agropecuario de Oaxaca (ITAO). Estas plántulas se micropropagaron a fin de obtener los ápices radiculares necesarios para determinar el número cromosómico de la especie.

Reactivos

Colchicina (Sigma C-9754), alcohol etílico absoluto (Merck 405111), ácido acético glacial (JT Baker 9507-05), cloroformo ACS (EMD CX1055-9), fucsina b Básica (Merck 15937), meta-bisulfito de sodio (JT Baker 3552-20), orceína propiónica (Sigma 0-7380), xileno ACS (JT Baker 9490-02), y bálsamo de Canadá (Fisher Scientific Company B-10).

Determinación del número cromosómico

Dentro de una caja petri de vidrio se colocó papel filtro número 2 humedecido con 8-hidroxiquinoleína 0.002 M y se conservó a 4 °C. Sobre el papel filtro se colocaron ápices de las radículas y se mantuvieron en estas condiciones durante 4, 5, 6 y 7 horas para después fijarlos sumergiéndolos en una solución de Carnoy (alcohol etílico absoluto, ácido acético glacial y cloroformo, 3:1:1) donde fueron conservadas hasta el aplastado. Los ápices, antes del aplastado, se hidrolizan en ácido clorhídrico 1N a 60 °C durante 10 minutos, pasado este tiempo se retira el ácido clorhídrico y los ápices se sumergen en el reactivo de Schiff preparado recientemente (0.1 g de fucsina básica, 0.3 mL de ácido clorhídrico concentrado, 4 g de bisulfito de sodio, 0.5 g de carbón activado, 100 mL de

agua destilada) durante 5 minutos a 60 °C. Los ápices se enfrían a temperatura ambiente. Después de 40 minutos se toma una pequeña porción del ápice radical y se coloca en un portaobjetos de vidrio, se agrega una gota de orceína propiónica (2%) se coloca un cubreobjetos de vidrio sobre el ápice para aplastar con el dedo pulgar con fuerza suficiente hasta que los cromosomas se extiendan. Las preparaciones son selladas con una mezcla de cera y parafina 1:1 para posteriormente congelarlas a -80 °C durante 24 horas. A continuación, el sello de parafina y cera se retira rápidamente junto con el cubreobjetos para sumergir la preparación en alcohol etílico absoluto durante 2 horas a temperatura ambiente y, después de este tiempo, las placas se extraen, se permite que se evapore por completo el alcohol y se sumergen entonces en xileno durante 10 minutos. Las preparaciones son secadas a temperatura ambiente, para posteriormente colocar sobre los portaobjetos en el lugar donde se encuentra impregnado el ápice, una gota de bálsamo de Canadá diluido con xileno, se cubre con un cubreobjetos nuevo y se seca en una plancha térmica a 30 °C durante 3 días. Las preparaciones son colocadas en el microscopio óptico Carl Zeiss, para observar y contar el número de cromosomas de 100 células.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Número cromosómico

De la observación de células somáticas en metafase, se determinó que el número cromosómico *L. halbingeriana* es $2n= 36$ (Figura 1), la familia Orchidaceae presenta una gran variación en el número cromosómico (Félix y Guerra 2010; Daviña *et al.*, 2009). Esta familia está integrada por aproximadamente 800 géneros con 1500 especies (Dole 2004). El género *Laelia* cuenta con 11 especies (White, 1996; Lee *et al.*, 2007) de las cuales se han reportado un número cromosómico variable desde 20 (Félix y Guerra, 2010) hasta 60 (Kamemoto, 1950).



Figura 1. Cromosomas de *L. halbingeriana* en metafase.

Al llevar a cabo la etapa de pre-tratamiento del material vegetal en la mezcla de colchicina con 8-hidroxi-oleína, se tuvo dificultad para visualizar los cromosomas y para contarlos debido a que se observaban muy pocas células en división, sin embargo, con solo colocar las raíces en 8-hidroxi-oleína se obtuvieron un mayor número de células en la

etapa de división requerida aunque a las 5 horas la dispersión y contracción de los cromosomas no eran suficientemente visibles.

La mayor dificultad para la observación de los cromosomas de *L. halbingeriana* estuvo determinada por el tiempo de exposición a la solución de 8-hidroxioléina, ya que a 3 y 4 horas de permanencia las raíces en ella no mostraban división alguna, asimismo con un tiempo de exposición mayor de 5 horas se obtuvo un efecto negativo en la dispersión de los cromosomas. Con un tiempo de exposición de 5 horas fue posible obtener las mejores preparaciones ya que los cromosomas se pudieron observar mejor que en los otros casos. Otro aspecto a destacar es la influencia en el tiempo de tinción, puesto que se observó que la tinción realizada entre un tiempo de 20 a 30 minutos, se obtuvo una tinción pobre y no se tiñeron todas las células de manera uniforme, a diferencia de cuando la tinción se llevó a cabo durante una hora o más y así logró la tinción apropiada que permitió la observación más clara, que puede atribuirse al hecho que el tejido es duro y ceroso lo que obstaculiza la penetración adecuada del colorante.

De un total de 100 células en metafase observadas, se encontró que en la mayoría de las células el número cromosómico fue de $2n=36$. Para *L. marginata* el número de cromosomas determinado es de 40, mientras que en *L. albida* va desde 40 hasta 63 y en *L. gouldiana* el número cromosómico va de 40 a 60. El número cromosómico determinado en *L. halbingeriana* puede deberse a su aislamiento geográfico o porque es una especie única y endémica de una región de la cañada de Oaxaca.

Estos resultados contribuyen a la caracterización de *L. halbingeriana*, al utilizar como criterio el número cromosómico, resultado que es importante ya que pocas especies de orquídeas han sido caracterizadas de esta manera. La propagación de planta de orquídea, en los programas de hibridación, se realiza mediante cultivo de tejidos y para demostrar que el proceso biotecnológico de micropropagación es seguro, es factible determinar en estas plantas su número cromosómico.

CONCLUSION

Se determinó que el número cromosómico de *L. halbingeriana* es $2n=36$

LITERATURA CITADA

- Daviña J.R.; Grabiele, M.; Cerutti, J.C.; Hojsgaard, D.H.; Almada, R.D; In saurral de IS, Honfi AI. 2009. Chromosom studies in Orchidaceae from Argentina. *Genetics and Molecular Biology* 32: 811–821.
- Dole, J. M. 2004. Floriculture. Principles and Species. Pearson Prentice Hall. New York. pp: 697-706.
- Felix. P. L. y Guerra M. 2010. Variation in chromosome number and the basic number of subfamil y Epidendroideae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 163: 234–278.
- Hágsater, E.; Soto, A. M. A.; Salazar, C. G.A.; Jimenez, M. M.A.; López, R. y Dressler R.L. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín. México. 304 p
- Kamemoto, H. 1950. Polyploidy in Cattleyas. *Amer.. Orch. Soc. Bull.* 19: 366-373.
- Lee, E. H., Laguna, C. A., Murguía, G. J., Elzorza, M. P., Iglesias, A. L., García, R. B., Barredo, P. F. y Santana, B. N. 2007. Regeneración *in vitro* de *Laelia anceps* ssp. *Dawsonii*. *Revista UDO Agrícola* 7 (1): 58-67.
- White, J. 1996. Taylor's Guide to Orchids. Frances Tenenbaum, Series Editor. New York: Houghton - Mifflin. Consultado en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Laelia>

CAPITULO III. PROPAGACIÓN *in vitro* DE *Laelia halbingeriana*

Artículo publicado en la Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, núm. 3, noviembre-diciembre, 2011, pp. 539-553

PROPAGACIÓN *in vitro* DE *Laelia halbingeriana*

RESUMEN

Laelia halbingeriana (Orchidaceae) es una planta epífita endémica de la cañada de Oaxaca amenazada por la reducción de su hábitat debido a deforestación, cambios de uso de suelo, extracción ilegal de plantas. Se desarrolló una metodología en el Colegio de Postgraduados en 2010 para su propagación *in vitro* como estrategia de conservación usando el medio de MS (1962) suplementado con 6-benciladenina (BA) (0.0, 2.22 y 4.43 $\mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$) y 3-ácido naftalenacético (ANA) (0.0, 2.60, 5.20 y 10.40 $\mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$). Con estos medios fueron cultivadas plántulas de 2.5 cm con tres concentraciones de sacarosa (58.43, 87.64 y 116.85 $\text{mM}\cdot\text{litro}^{-1}$) y cinco de sales minerales del medio MS (50, 75, 100, 125 y 150 %). Para el enraizamiento, las plántulas fueron cultivadas en medio MS suplementado con cinco concentraciones de ANA (0.0, 2.60, 7.80, 10.40 y 13.00 $\mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$) y cinco de ácido 3-indolbutirico (AIB) (0.0, 4.92, 7.38, 9.84 y 12.30 $\mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$). Se utilizó el diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial y diez repeticiones. En la multiplicación, el BA (2.22 $\mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$) incrementó el número promedio de hojas por planta (3.93), mientras que la mayor longitud (1.11 cm) se logró al adicionar ANA (5.20 $\mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$). La concentración de azúcar y las sales minerales no influyeron en la organogénesis *in vitro* de *L. halbingeriana*. En el enraizamiento, el mayor número de raíces por planta (2.62) se obtuvo reduciendo las sales minerales a 75 %, la adición de 7.80 $\mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$ de ANA incrementó el número de raíces (2.86).

Palabras clave: Orchidaceae, sales minerales, fitoreguladores

ABSTRACT

Laelia halbingeriana (Orchidaceae) is an epiphyte plant endemic from the Oaxaca glen which is threatened by the reduction of its habitat due to deforestation, changes in the use of soil and illegal extraction of plants. A methodology was developed at Colegio de Postgraduados in 2010 for its *in vitro* propagation as a preservation strategy using the MS medium (1962) supplemented with 6-benciladenine (BA) (0.0, 2.22 and 4.43 $\mu\text{M}\cdot\text{liter}^{-1}$) and 3-naftalenacetic acid (ANA) (0.0, 2.60, 5.20 and 10.40 $\mu\text{M}\cdot\text{liter}^{-1}$). With those media, 2.5 cm seedlings were grown with three sucrose concentrations (58.43, 87.64 and 116.85 $\text{mM}\cdot\text{liter}^{-1}$) and five of mineral salts of the MS medium (50, 75, 100, 125 and 150 %). For the rooting, seedlings were grown in the MS medium supplemented with five concentrations of ANA (0.0, 2.60, 7.80, 10.40 and 13.00 $\mu\text{M}\cdot\text{liter}^{-1}$) and five of 3-indolbutiric acid AIB) (0.0, 4.92, 7.38, 9.84 and 12.30 $\mu\text{M}\cdot\text{liter}^{-1}$). A completely random experimental design was used with a factorial array and ten repetitions. At multiplication stage, BA (2.22 $\mu\text{M}\cdot\text{liter}^{-1}$) increased the average number of leaves per plant (3.93), while the largest length (1.11cm) was achieved by adding ANA (5.20 $\mu\text{M}\cdot\text{liter}^{-1}$). Sugar and mineral salts concentrations did not influence the *in vitro* organogenesis of *L. halbingeriana*. At rooting stage, the largest number of roots per plant (2.62) was obtained by reducing the mineral salt concentration at 75%. Addition of 7.80 $\mu\text{M}\cdot\text{litre}^{-1}$ of ANA increased the number of roots (2.86).

Key words: Orchidaceae, mineral salts, plant growth regulators

INTRODUCCIÓN

Laelia halbingeriana (familia *Orchidaceae*) es una planta epífita endémica de la cañada de Oaxaca, en la reserva de la Bósfera Tehuacán-Cuicatlán, amenazada por la reducción de su hábitat debido a factores como la deforestación, cambios en el uso de suelo y extracción ilegal de plantas (Hángsater *et al.*, 2005) lo que aumenta el riesgo de su desaparición. Existen muy pocos estudios acerca de su reproducción. En este tipo de plantas, la reproducción sexual de forma natural es limitada debido a la naturaleza de la semilla (tamaño pequeño con poca o nula materia de reserva) por lo que la germinación así como los estados de desarrollo subsecuentes dependen de la relación simbiótica con un hongo micorrízico (*Rhizoctonia solani*) (Mosquera-Espinosa *et al.*, 2010; Otero *et al.*, 2007; Suarez *et al.*, 2006). Porras *et al.* (2007) señalan que cada especie tiene una especificidad por el hongo micorrizico.

La germinación de semillas *in vitro* es una alternativa de reproducción viable pues es posible sustituir la acción de los hongos micorrízicos con el medio de cultivo (Gil *et al.*, 2007; Otero y Bayman 2009). Mediante este método se logra, además, incrementar la variabilidad genética de la especie. Para la propagación de orquídeas, se han estudiado los medios de cultivo mínimos, la constitución de reguladores de crecimiento así como la acción benéfica de la peptona y el carbón activo entre otros aditivos (Ouyang *et al.*, 2006); sin embargo, la respuesta morfogénica de los tejidos dependen del tipo y concentración de los reguladores de crecimiento. Para la propagación de orquídeas se han empleado principalmente las citocininas naturales 2-isopenteniladenina (2iP) y la zeatina y las citocininas sintéticas N6 –benciladenina (BA) y la cinetina (6-furfuril-aminopurina), en

concentraciones de 0.01 a 10 mg L⁻¹; donde esta última es la menos eficiente de las cuatro.

También se ha postulado que la concentración de sales minerales y de sacarosa son factores determinantes en el proceso de organogénesis *in vitro* de estas plantas (Sorace *et al.*, 2008). La mayor formación de plántulas *in vitro* de *L. speciosa* fue lograda por Sarabia *et al.* (2010), al adicionar al medio de cultivo ANA (0.5 mg L⁻¹) y ácido giberélico (AG₃) (0.1 mg L⁻¹) quienes obtuvieron 70 % de supervivencia al ser aclimatadas.

Aunque ya se han establecido metodologías para propagar *in vitro* plantas de orquídea de diferentes géneros, existen pocos estudios en *L. halbingeriana*, por lo que es factible modificar las condiciones conocidas para mejorar los resultados de la micropropagación como una estrategia inicial para asegurar posteriormente la conservación en su ambiente natural. Basados en lo expuesto previamente, el objetivo de la presente investigación fue establecer un método práctico y competitivo para propagar *in vitro* *L. halbingeriana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Multiplicación de plántulas

Plántulas de *L. halbingeriana* cultivadas *in vitro* fueron proporcionadas por el Dr. Raymundo Enríquez del Valle provenientes del Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto Tecnológico Agropecuario de Oaxaca (ITAO).

Medios de cultivo

El medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS, 1962) fue utilizado como base de los medios preparados. Todos los medios de cultivo contenían 2.96 μM de tiamina, 5.55 μM de mio-inositol, 6 g L^{-1} de agar (Merck[®]) y el pH fue ajustado a 5.7 ± 0.1 antes de agregar el agar. El medio se esterilizó a 121 °C (1.05 kg por cm^2) durante 17 minutos. Todas las cantidades expresadas en la composición de los medios están dadas por litro de medio, a menos que otra cosa sea indicada.

Las plántulas fueron originalmente cultivadas en una serie de 12 medios (Cuadro 1) para determinar la condición más favorable para multiplicar el número de plantas. Todos los cultivos fueron conservados durante 60 días en un cuarto de incubación a 25 ± 2 °C, 16 h de fotoperiodo con intensidad lumínica de 76 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ producida por lámparas de luz blanca fría fluorescente. Se determinó el desarrollo de las plántulas durante un periodo de 60 días.

Cuadro 1. Composición química de los medios de cultivo. Los medios contenían la concentración de sales minerales del medio de cultivo MS al 100 % y 87.64 mM de sacarosa.

Medio MS:	BA (µM)	ANA (µM)	Medio MS:	BA (µM)	ANA (µM)
1	0	0	7	2.22	5.20
2	0	2.60	8	2.22	10.40
3	0	5.20	9	4.43	0
4	0	10.40	10	4.43	2.60
5	2.22	0	11	4.43	5.20
6	2.22	2.60	12	4.43	10.40

Para evaluar el efecto de la concentración de sales minerales y sacarosa en el desarrollo de las plántulas *in vitro* de *L. halbingeriana* fueron seleccionados nuevos explantes de aproximadamente 2.5 cm de longitud y se sometieron a 15 tratamientos conformados por tres concentraciones de sacarosa (58.43, 87.64 y 116.85 mM), combinadas con cinco concentraciones de las sales minerales totales del medio MS (50, 75, 100, 125 y 150 %) como se indica en el Cuadro 2.

En el tercer ensayo, brotes vigorosos de aproximadamente 3.0 cm de longitud se seleccionaron para cultivarlos en una serie de 25 medios que contenían 87.64 mM de sacarosa. En este caso fue evaluada la combinación de ANA (0.0, 5.20, 7.80, 10.40 y 12.30 µM) con AIB (0.0, 4.94, 7.38, 9.84 y 12.30 µM) para inducir el enraizamiento *in vitro* de las plántulas (Cuadro 3). A cada frasco de 100 ml de capacidad se adicionaron 25 mL de

medio de cultivo, fueron sembrados 10 explantes para generar un total de 30 explantes por tratamiento. Los explantes se mantuvieron por 60 días en el cuarto de incubación a 25 ± 2 °C, 16 h de fotoperiodo con intensidad lumínica de $76 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ producida por lámparas de luz blanca fría fluorescente. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con arreglo factorial 3×4 , 5×3 y 5×5 en el primero segundo y tercer experimento, respectivamente.

Cuadro 2. Composición química de los medios de cultivo. Los 15 medios contenían 2.22 μM de BA y 5.20 μM de ANA así como la concentración de sales del medio MS y las cantidades de sacarosa indicadas.

Medio	Concentración	Sacarosa	Medio	Concentración	Sacarosa
MS:	de sales (%)	(mM)	MS:	de sales (%)	(mM)
13	50	58.43	21	125	87.64
14	75	58.43	22	150	87.64
15	100	58.43	23	50	116.85
16	125	58.43	23	75	116.85
17	150	58.43	25	100	116.85
18	50	87.64	26	125	116.85
19	75	87.64	27	150	116.85
20	100	87.64			

Variables evaluadas y análisis estadístico

Las variables evaluadas en todos los casos fueron: número y longitud de hojas, altura de plántula, número de raíces, longitud de raíces. Con los datos obtenidos se hizo un

análisis de varianza y se llevó a cabo una prueba de comparación de medias Tukey a una $P \leq 0.05$ con el paquete estadístico SAS versión 9.1 (SAS, 2003).

Cuadro 3. Composición de una serie de 25 medios que contenían la concentración 100 % de sales minerales MS y 87.64 mM de sacarosa. Los medios contenían las cantidades de ANA y AIB indicadas.

Medio MS:	ANA (μM)	AIB (μM)	Medio MS:	ANA (μM)	AIB (μM)
28	0	0	41	7.80	9.84
29	0	4.94	42	7.80	12.30
30	0	7.38	43	10.40	0
31	0	9.84	44	10.40	4.94
32	0	12.30	45	10.40	7.38
33	5.20	0	46	10.40	9.84
34	5.20	4.94	47	10.40	12.30
35	5.20	7.38	48	13.00	0
36	5.20	9.84	49	13.00	4.94
37	5.20	12.30	50	13.00	7.38
38	7.80	0	51	13.00	9.84
38	7.80	4.94	52	13.00	12.30
40	7.80	7.38			

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del tipo y concentración de fitohormonas en la etapa de multiplicación *in vitro* de plántulas de *L. halbingeriana*

Se observaron diferencias estadísticas significativas en la respuesta de las plantas respecto a los tratamientos. Con la adición de 2.22 μM de BA se obtuvieron hasta 3.93 hojas en promedio, mientras que al duplicar dicha concentración la formación de hojas se redujo en 13 % (Figura 1 A). El número de hojas no se vio afectado por la presencia de ANA en el medio de cultivo (Figura 1B). En cuanto a la longitud de las hojas se encontró que con la adición de BA no se observaron diferencias entre los tratamientos para esta variable (Figura 1C). En el híbrido de *Brassocattleya* `Pastoral´ x *Laeliocattleya* `Amber Glow´ mientras Araujo *et al.* (2006), encontraron en esta especie que la adición de bajas concentraciones de BA incrementaron el número de brotes. Estos resultados coinciden con los encontrados por Saravia-Ochoa *et al.* (2010), quienes con la adición de BA obtuvieron la mayor formación de callo así como la mejor calidad del mismo en *L. speciosa*; Sin embargo, se logró estimular la longitud de hojas al utilizar ANA en el medio de cultivo, pues con 5.20 $\mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$ de ANA se incrementó la longitud de las hojas hasta 1.45 cm y al reducir su concentración a 2.6 $\mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$ la longitud se redujo en 31 % (Figura 1 D). Estos datos contrastan con los registrados por Coello *et al.* (2010) quienes en *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressier & W.E.Higgins obtuvieron el mayor número de brotes (10.6) al utilizar concentraciones de 16.1 y 0,0023 μM de BA. En el estudio realizado por Suárez-Quijada *et al.* (2010) encontraron que la adición de BA tiene mayor influencia que el ANA en la propagación de *in vitro* de *Euchile mariae*.

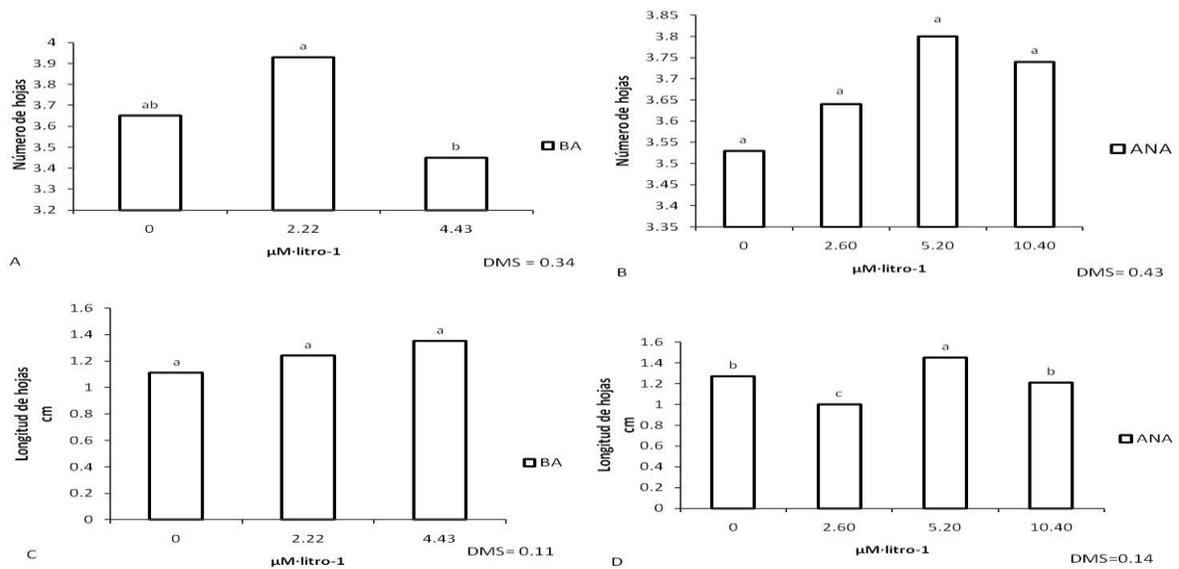


Figura 1. Efecto de la concentración de BA (A y C) y concentración de ANA (B y D) en el número y longitud de las hojas formadas *in vitro* de *L. halbingeriana* en un periodo de cultivo de 60 días.

La ausencia de BA en el medio de cultivo influyó negativamente en el crecimiento de las plántulas desarrolladas *in vitro*, ya que sólo alcanzaron 1.96 cm de altura (Figura 2 A), sin embargo, al adicionar 4.43 $\mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$ de BA se incrementó la altura de planta (2.19 cm). Se encontró una respuesta similar al adicionar ANA al medio de cultivo ya que a 5.20 $\mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$ se obtuvo la mayor altura por explante (2.24 cm), y cuando se redujo hasta 2.60 $\mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$ la altura de las plántulas disminuyó en promedio (1.97 cm), además se observó que tanto la ausencia de ANA en el medio como la concentración de 10.40 $\mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$ presentaron el mismo efecto inhibitorio en la altura promedio de las plántulas.

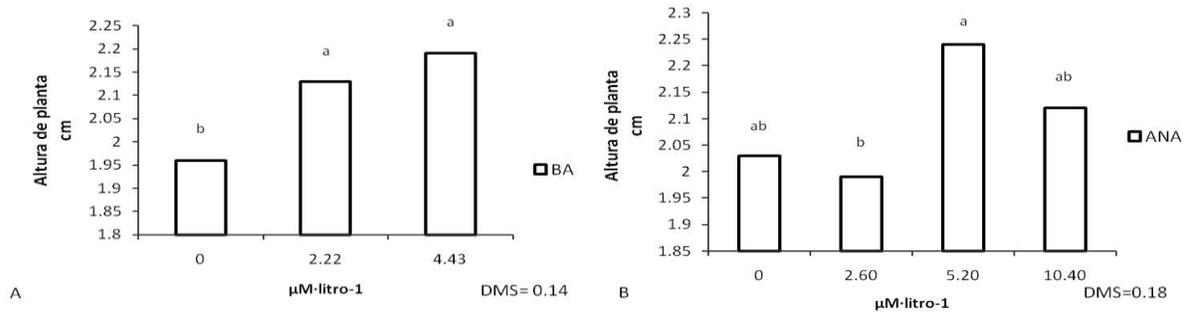


Figura 2. Efecto de la concentración de BA (A) y ANA (B) en la altura de plantas formadas *in vitro* de *L. halbingeriana* en un periodo de 60 días.

El proceso de rizogénesis también fue afectado por los dos tipos de fitohormonas utilizadas (Figura 3). La presencia de BA influyó en el número de raíces ya que al adicionar 2.22 y 4.43 $\mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$ se obtuvieron 1.82 raíces en promedio sin ser estadísticamente diferente al testigo sin BA en el cual únicamente se obtuvieron 1.55 raíces en promedio por plántula. En cuanto a la longitud promedio de las plántulas, la adición de 4.43 $\mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$ de BA numéricamente fue mejor al obtener una longitud de 1.14 cm sin ser estadísticamente diferentes a las plantas de los otros tratamientos utilizados.

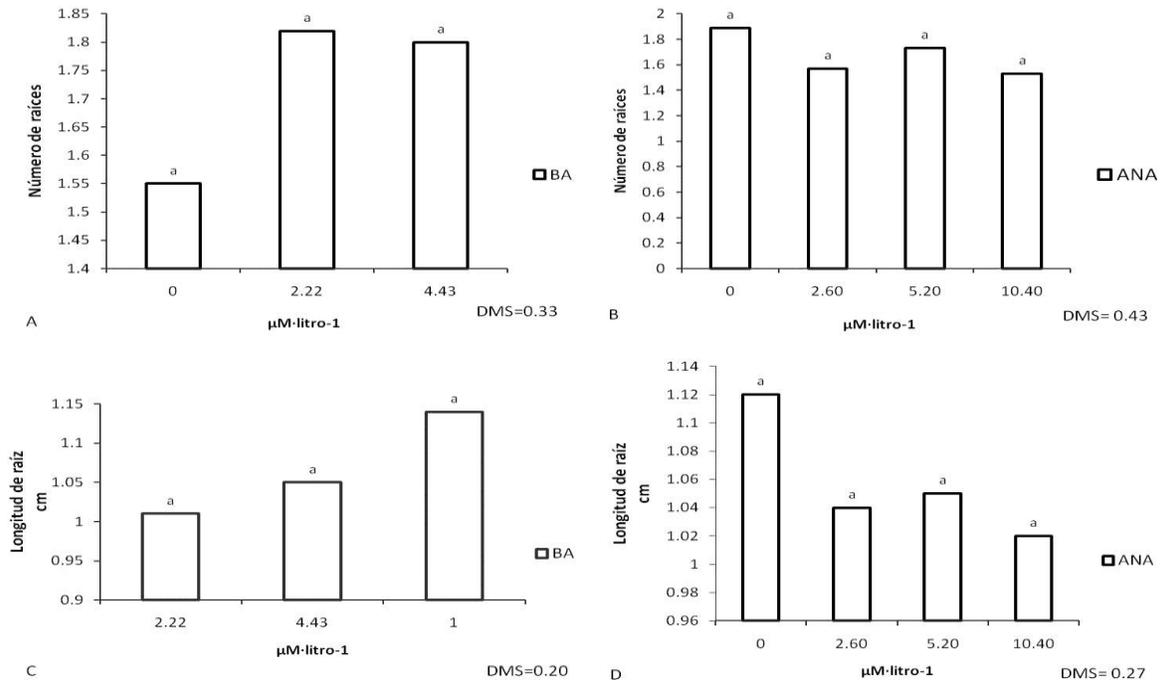


Figura 3.Efecto de la concentración de BA (A y C) y de ANA (B y D) sobre el número y longitud de las raíces formadas *in vitro* de *L. halbingeriana* a los 60 días de incubación

Con el regulador de crecimiento ANA la respuesta de las plántulas fue negativa ya que al no adicionar esta fitohormona el número de raíces fue mayor (1.89) y al adicionar $10.40 \mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$ se inhibe la formación en 20 %; la longitud de raíces tuvo un efecto similar al encontrarse que numéricamente es mejor en ausencia de ANA en el medio (1.12 cm) mientras que la adición de $10.40 \mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$ sólo se obtuvo un incremento promedio de 1.02 cm.

**Efecto de la concentración de sacarosa y sales minerales en la propagación de
plántulas de *L. halbingeriana***

La concentración de sacarosa no afectó la organogénesis *in vitro* de *L. halbingeriana* (Cuadro 4). Sin embargo, la concentración de 87.64 mM·litro⁻¹ favoreció su crecimiento debido a que el potencial osmótico que generó esta cantidad de sacarosa permitió a la plántula absorber agua y nutrientes. En cambio, el adicionar 116.85 mM·litro⁻¹ de sacarosa al medio de cultivo disminuyó considerablemente el potencial osmótico lo que dificulta la absorción de agua y nutrientes hacia el interior de las plántulas, por lo que el crecimiento de las hojas fue limitado.

Cuadro 4. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la organogénesis *in vitro* de *Laelia halbingeriana* a los 60 días de incubación.

Sacarosa mM·litro⁻¹	Número de hojas	Longitud de Hojas (cm)	Número de Raíces	Longitud de Raíces (cm)	longitud del explante (cm)
58.43	3.59 a ^{zy}	0.98 b	1.95 a	0.78 a	0.82 a
87.64	3.77 a	1.07 a	1.91 a	0.82 a	0.88 a
116.85	3.69 a	1.00 ab	2.11 a	0.80 a	0.87 a
DMS	0.24	0.07	0.57	0.23	0.07

^Z Medias con la misma literal en cada columna son iguales estadísticamente al 0.05 de probabilidad según la prueba de tukey. ^Y media de 30 observaciones en cada tratamiento

La concentración de sales minerales en el medio no afectó el número ni la longitud de hojas, resultados que contrastan con los obtenidos por Romero-Tirado *et al.* (2007) quienes señalan que al utilizar sales minerales a 50 y 100 % de su concentración se obtiene una mayor cantidad de plántulas desarrolladas *in vitro* de *L. anceps*. El proceso de rizogénesis fue afectado por la concentración de las sales minerales ya que tanto las altas concentraciones como las bajas concentraciones de sales minerales (150 y 50 %), disminuyen la formación de raíces (1.65) en promedio, mientras que una concentración de 75 % promueve su formación (2.62) raíces por planta en promedio. Sin embargo, la concentración de sales minerales no afectó el crecimiento de las raíces (Cuadro 5). Estos datos contrastan con los obtenidos por Romero-Tiarado *et al.* (2007) quienes determinaron que en los medios MS al 50 % y al 100 % no existen diferencias en el enraizamiento de *L. anceps* subsp. *Anceps*.

Cuadro 5. Efecto de la concentración de sales minerales MS sobre la organogénesis *in vitro* de *L. halbingeriana* los 60 días de incubación.

Sales minerales	Número de	Longitud de	Número de	Longitud de	longitud del
%	hojas	Hojas (cm)	Raíces	Raíces (cm)	explante (cm)
150	3.82 a	1.03 a	1.68 b	0.85 a	0.88 a
125	3.70 a	0.98 a	1.78 ab	0.83 a	0.89 a
100	3.85 a	1.06 a	2.15 ab	0.87 a	0.90 a
75	3.52 a	0.99 a	2.62 a	0.74 a	0.83 a
50	3.56 a	1.04 a	1.65 b	0.66 a	0.79 a
DMS	0.36	0.10	0.85	0.34	0.10

^Z Medias con la misma literal en cada columna son iguales estadísticamente al 0.05 de probabilidad según la prueba de tukey. ^Y media de 30 observaciones en cada tratamiento

Se observaron diferencias en el promedio de formación de hojas por efecto de la interacción entre concentraciones de sacarosa y sales minerales contenidas en el medio de cultivo. En la figura 4 A se muestra que el medio con 150 % de sales minerales y 116.85 mM·litro⁻¹ de sacarosa, favoreció la formación de hojas por planta (4.03), mientras que al disminuir el porcentaje de sales minerales a 50 % de concentración, con la misma cantidad de sacarosa, se observó una disminución del promedio de producción de hojas por plántula a 3.13. Estos datos contrastan con los resultados obtenidos por Sorace *et al.* (2008) quienes señalan que al adicionar 116.85 mM· litro⁻¹ de sacarosa y 50 % de la concentración de sales minerales en el medio MS se obtiene mayor desarrollo de plántulas de *Oncidium baueri*.

El tratamiento que contenía 50 % de sales minerales y 87.64 mM·litro⁻¹ de sacarosa favoreció la longitud de las hojas (1.12 cm de longitud); mientras que 58.43 mM·litro⁻¹ de sacarosa y 75 % de sales minerales disminuyeron la longitud de las hojas (0.84 cm) (Figura 4 B). Estos resultados coinciden con los de Tirado et al. (2005) quienes al adicionar 58.43 mM·litro⁻¹ de sacarosa propiciaron un mayor crecimiento foliar en híbridos de *Phalaenopsis*.

El proceso de rizogénesis en *L. halbingeriana* no fue afectado por la combinación de sales minerales y sacarosa en el medio de cultivo; Moreno y Menchaca (2007) observaron que al adicionar pulpa de plátano al medio de cultivo se aumenta el número de raíces formadas *in vitro*, así como la formación de pseudobulbos en *Stanhopea tigrina* Bateman.

La concentración de sales minerales de 150, 125, 100, 75 % en interacción con 116.85 mM·litro⁻¹ de sacarosa, indujeron mayor altura de planta (0.95 cm de altura) (Figura 4 C) este mismo resultado se observó en la interacción de 100 % de sales minerales y 87.64 mM·litro⁻¹. Por el, contrario, la reducción de las sales minerales a 50 % con 116.85 mM·litro⁻¹ de sacarosa afectó negativamente el crecimiento de las plántulas de *L. halbingeriana* ya que sólo se obtuvo 0.65 cm de altura de planta. Estos resultados contrastan con los de Sorace *et al.*(2008) quienes utilizaron la concentración de sales minerales al 100 % del medio Knudson C para crecer *in vitro* el híbrido de *Dendrobium nobile*; esta concentración favoreció el crecimiento de la parte aérea del híbrido.

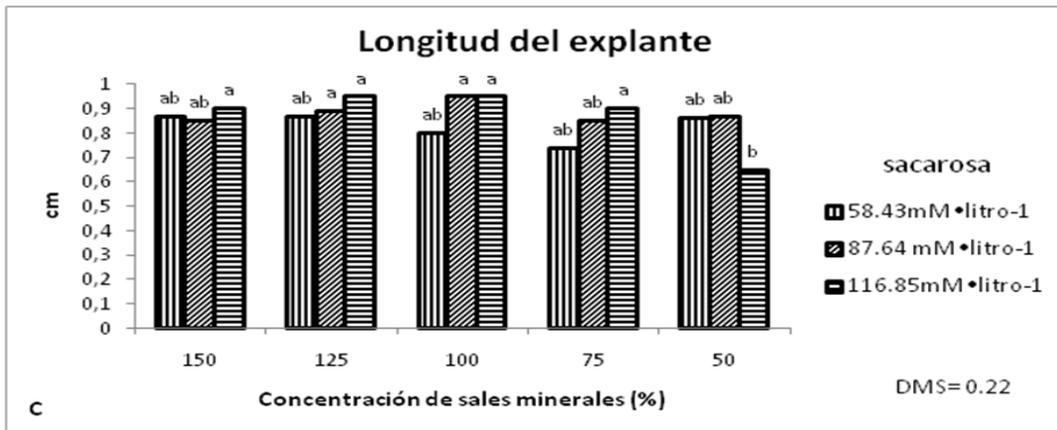
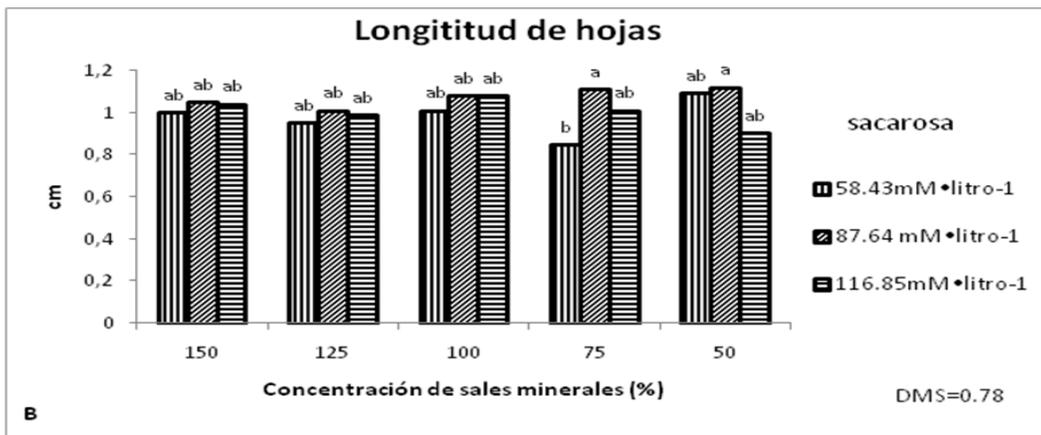
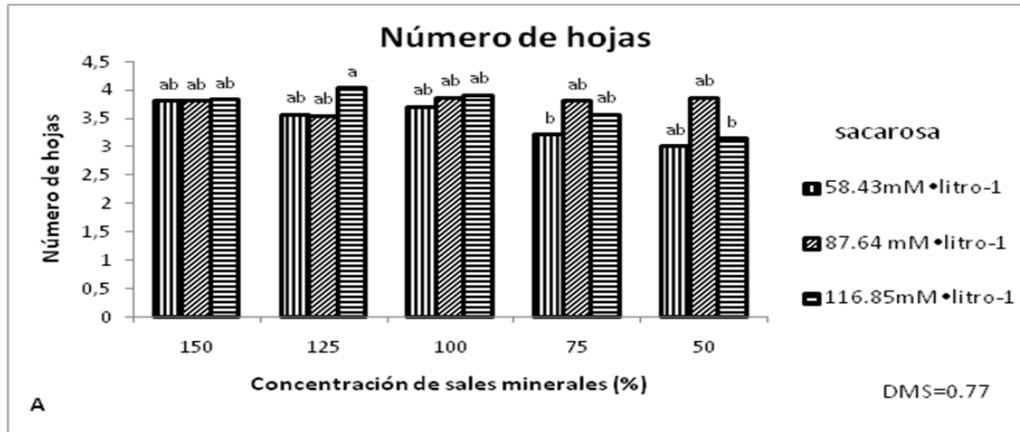


Figura 4. Número de hojas (A), longitud de hojas (cm) (B), altura de planta (C) desarrollados *in vitro* de *Laelia halbingeriana* en un periodo de 60 días.

Efecto de la fuente y concentración de auxina en la rizogénesis *in vitro* de *L.*

halbingeriana

En la figura 5 A se observa que en ausencia de ANA disminuye el número de raíces, y su aplicación lo incrementa, aunque no se encontraron diferencias significativas con dosis entre 5.20 y 13.00 $\mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$ de ANA.

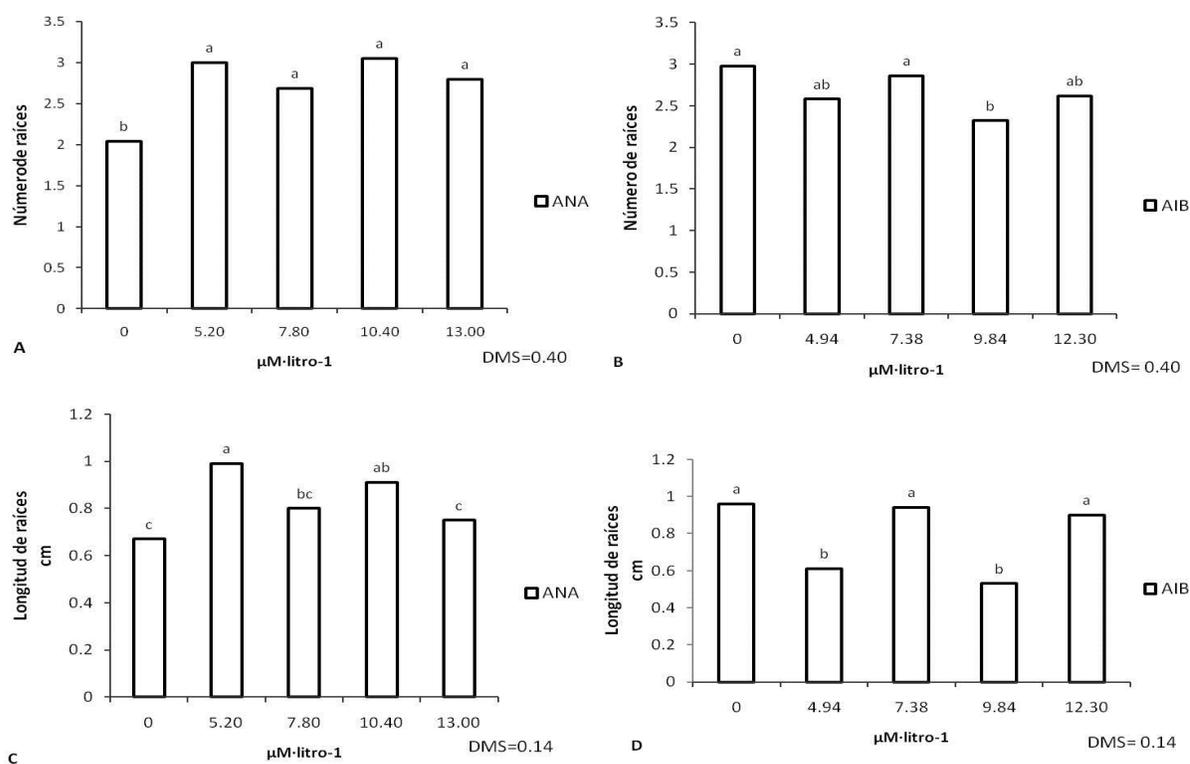


Figura 5. Influencia de la concentración de ANA (A y C) y concentración de AIB (B y D) sobre el número y longitud de las raíces formadas *in vitro* de *L. halbingeriana* a los 60 días de incubación.

Se observó que tanto la ausencia como la concentración alta de ANA ($13.00 \mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$) produjeron plántulas con raíces de menor longitud, 0.67 y 0.75 cm respectivamente (Figura 5 C) en contraste Pardo *et al.*, (2008), encontraron que el número de raíces de brotes en *Billbergia rosea* se incrementan (8.95) con una concentración de ANA $1.0 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$.

El AIB afectó marginalmente la rizogénesis ya que tanto su ausencia como la adición de $7.38 \mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$ promovieron la formación de raíces, en concentraciones de 2.98 y $2.86 \mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$ respectivamente. Sin embargo, con $9.84 \mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$ de AIB disminuyó en 22 % la formación de raíces (Figura 5 B). En la Figura 5D se observa el efecto de la concentración de AIB en la longitud de las raíces. Los resultados mostraron, que para una mayor longitud de raíces la adición de 7.38 y $12.30 \mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$ de AIB, así como la ausencia de ella, promovieron el tamaño de las raíces (0.9 cm), esto se puede deber al contenido endógeno de auxinas de los explantes, sin embargo al adicionar $12.30 \mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$ de AIB la longitud de las raíces disminuye 41 %. Al adicionar $13.00 \mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$ de ANA al medio, se obtuvo el máximo número de hojas (3.8 hojas por planta) sin embargo, con $5.20 \mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$ de ANA se obtuvo la mayor longitud de 1.25 cm. En la figura 6 A y C se observa que la ausencia de la hormona produjo el menor número de hojas por planta (3.1) y longitud (1.07 cm) de hojas.

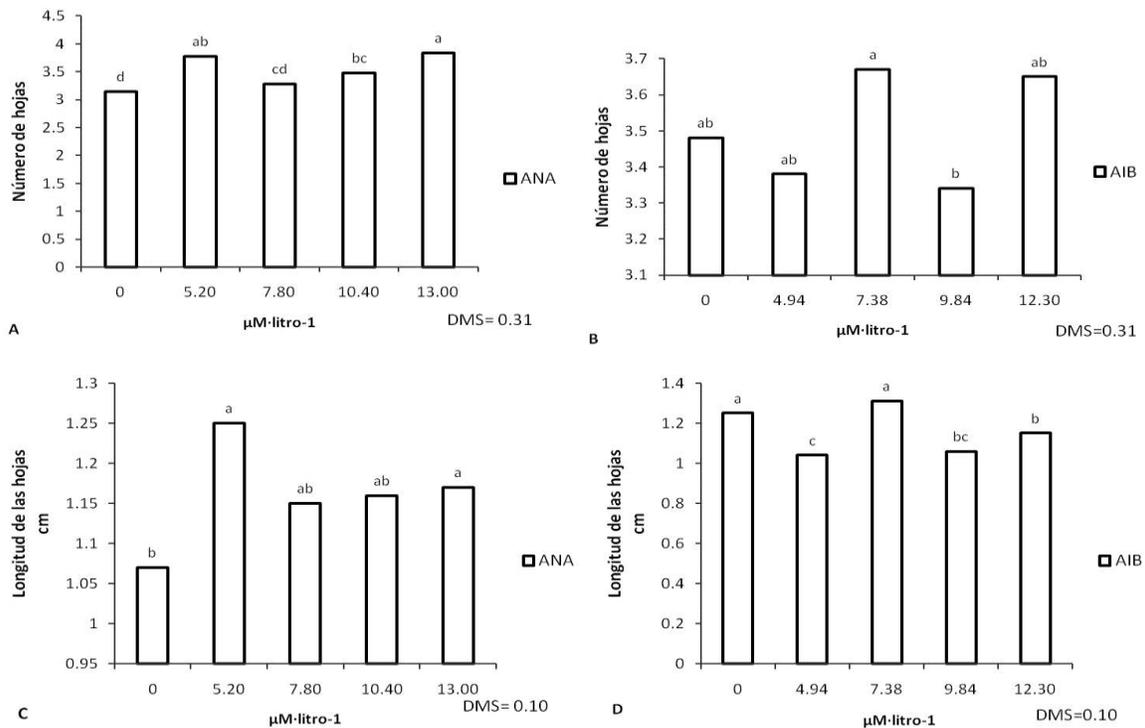


Figura 6. Influencia de la concentración de ANA (A y C) y concentración de AIB (B y D) en el número y longitud de hojas formadas *in vitro* de *L. halbingiana* a los 60 días de incubación.

Por otro lado, la concentración de $7.38 \mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$ de AIB fue más favorable, ya que se obtuvieron en promedio 3.67 hojas por planta, y al incrementar la concentración hasta $9.84 \mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$ disminuyó el número de hojas en 10 %. Con respecto a la longitud de las hojas, 0.0 y $7.38 \mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$ produjeron hojas más largas en 1.25 y 1.31 cm respectivamente. Sin embargo, se afectó negativamente hasta en un 20 % la longitud de las hojas cuando la concentración de AIB fue de $12.30 \mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$ (Figuras 6 B y D).

Con respecto a la altura de planta, la concentración alta de ANA de $13.00 \mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$ produjo las plantas más altas, de 1.13 cm en promedio, sin embargo, en ausencia del mismo, solo alcanzaron 86 % de este crecimiento (Figura 7 A). El AIB produce un valor máximo de altura de planta a la concentración de $7.38 \mu\text{M}\cdot\text{litro}^{-1}$ valores superiores o inferiores disminuyen esta variable respuesta hasta en 20 % (Figura 7 B).

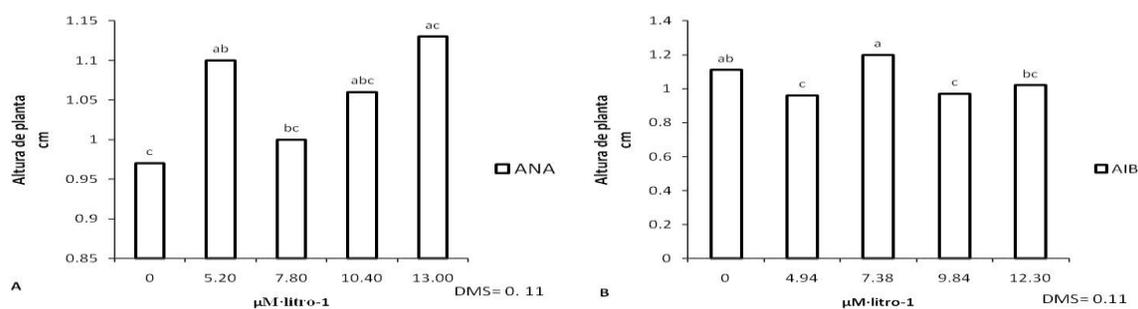


Figura 7. Efecto de la concentración de ANA (A) y de AIB (B) en la altura de plantas formadas de *L. halbingeriana* *in vitro* a los 60 días de incubación.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados de este trabajo, para la propagación *in vitro* de *Laelia halbingeriana* se logró establecer un método práctico.

Para la formación de hojas el mejor promotor fue BA en una concentración de $2.22 \mu\text{M}$ litro^{-1} en el medio de cultivo MS (1962).

De manera general la concentración de sales minerales en el medio y la concentración de azúcar no influyeron en la formación de hojas y raíces generadas *in vitro* de *Laelia halbingeriana*.

En la fase de enraizamiento *in vitro* la adición de ANA al medio de cultivo promovió el enraizamiento.

LITERATURA CITADA

- Araujo, A.G.; Pasqual, M. Pereira, A. R.; Souza, R. H. 2006. Crecimiento *in vitro* de *Laelia tenebrosa* (Orquidácea) em diferentes concentrações de sais de Knudson C e carvão ativado. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, 2(2):53-106.
- Coello, C. Y; Miceli1, C. L.; Orantes, C.; Dendooven, L.; Gutiérrez, F. A. 2010. Plant growth regulators optimization for *in vitro* cultivation of the orchid *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressier & W.E.Higgins. *Gayana Bot.* 67(1): 19-26.
- Gil, I. V.; Bastida A. T.; Flores, G.E.; Navarro, E.L. 2007.Reproducción y manejo de orquídeas Mexicanas. Universidad Autonoma Chapingo. México. pp 31-42.
- Hágsater, E.; Soto, A. M. A.; Salazar, C. G.A; Jiménez, M. M.A. López, R. Y Dressler R.L. 2005. 304 p Las orquídeas de México. Instituto Chinoín. México.
- Knudson L (1946) A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *Am Orchid Soc Bull* 15:214–217.
- Moreno, M. D. y Menchaca G. R. (2007). Efecto de los compuestos orgánicos en la propagación *in vitro* de *Stanhopea tigrina* Bateman (Orchidaceae). *Foresta Veracruzana* 9(2):27-32.
- Mosquera, E. A; Bayman, P; Túoac, O. J. 2010. *Ceratobasidium* como hongo micorrízico de orquídeas en Colombia. *Acta Agronómica.* 59 (3): 316-326.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

- Otero, J. T. y Bayman, P. 2009. Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epífitas. *Acta Agronómica* 58(4):270-276.
- Otero, J.; Flanagan, N.; Herre, A.; Ackerman, J.; y Bayman, P. 2007. Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (orchidaceae) *Am. J. Bot.* 94(12):1944 – 1950.
- Ouyang, T. Chen, S. Wang f. S. 2006. Key Technology study on *Oncidium* industrial propagation by tissue culture. *Forest Research* 19(5): 606-611.
- Pardo, A.; Michel C. A.; Magallón, N.; Alvarado, G. 2008. Regeneración *in vitro* de *Billbergia rosea* hortus ex beer a partir de ápices caulinares *Bol. Centro Invest. Biol* 42 (4):491-505.
- Porras-Alfaro, A. y Bayman, P. 2007. Mycorrhizal fungi of Vanilla: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. *Mycol.* 99(4):510 - 525.
- Romero, T. R.; Rosales, S. B. A. L.; Álvarez, A. B. 2007. Uso de complejos comerciales como sustitutos de componentes del medio de cultivo en la propagación *in vitro* de *Laelia anceps*. *Lankesteriana* 7 (1-2):353-356.
- Sarabia, O. M. E; Ávila, D. I.; Gomez A. C.; Salgado G. R. 2010. Callus growth and plant regeneration in *Laelia speciosa* (Orchidaceae) *LANKESTERIANA* 10(1): 13—18.
- SAS Institute 2003 SAS/STAT User's Guide Release 9.1 ed, Cary, NC, USA.
- Sorace, M.; Tadeu, F. R.; Damasceno, J. C. V.; Gomes, G. P.; Muniz, B. C.; Nesello, F. G.; Lopez, S. G.; Assari, T. L. S.; Schnitzer, A. J. 2008. Crecimiento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, 29(4): 775-782.

- Suarez, Q. I.; Hernández, A. M.; Chávez, A. V.; Sandoval, Z.; Martínez, P. 2007. Propagación *in vitro* y aclimatación de *Euchile mariae* (Ames) Withner (Orchidaceae) *Lankesteriana* 7(1-2): 388-393.
- Suarez, JP; Michael, W; Abele, A; Garnica, S; Oberwinklerb, F; y Kottke, I. 2006. Diverse tulasnelloid ungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycol. Res.* 110:1257 - 1270.
- Tirado, M. J.; Naranjo, E. J; Atehorutúa, L. 2005. Propagación *in vitro* de *Phalenopsis* (Orchidaceae) a partir de protocormos, mediante el sistema de inmersión temporal "RITA" 7(1):25:31.

**CAPITULO IV. Determinación de clorofila durante la aclimatación de *Laelia*
*halbingeriana***

DETERMINACIÓN DE CLOROFILA DURANTE LA ACLIMATACIÓN DE

Laelia halbingeriana

RESUMEN

En la micropropagación de *Laelia halbingeriana* la aclimatación es una de las etapas en las que presentan mayores dificultades debido al bajo porcentaje de supervivencia. El presente trabajo tuvo como objetivos evaluar la eficiencia de sustratos de origen vegetal y el uso de enraizador en explantes de *L. halbingeriana* así como la relación entre color del explante y el contenido de clorofila durante la etapa de aclimatación. Las plántulas provenientes del cultivo de tejidos fueron cultivadas en charolas de plástico en condiciones de invernadero. Los sustratos utilizados fueron la corteza de encino y el peat moss, con y sin enraizador, se comparó el crecimiento y desarrollo de las plántulas *in vitro* e *in vivo*. Después de 8 meses del inicio de los experimentos, las variables evaluadas fueron: altura de planta, número y longitud de hojas, número y longitud de raíces. La reflectancia de las hojas estuvo influenciada por el contenido de sales minerales así como la concentraciones de ANA al medio de cultivo, además se cuantificó el contenido de clorofila mediante el método de N-N-Dimetilformamida y las mediciones SPAD de hojas de diferentes tonalidades de verde. El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro repeticiones. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza complementados con la prueba de Tukey al 5 %. Los resultados mostraron que la corteza de encino, fue el sustrato que favoreció el enraizamiento y supervivencia de las plántulas en la etapa de aclimatación, además se encontró una relación positiva entre contenido de clorofila y las lecturas SPAD.

Palabras claves: *Laelia*, orquídeas, SPAD, determinación de clorofila.

ABSTRACT

For the micropropagation of *Laelia halbingeriana*, acclimatization is one of the stages which present most difficulties because of the low survival percentage. The present work has as a goal to evaluate the efficiency of the substrates of vegetal origin and the use of roofer in explants of *L. halbingeriana* as well as the color of the explant and the chlorophile content during the acclimatization stage. Seedlings coming from the tissue culture were grown in plastic trays under greenhouse conditions. The used substrates were oak crust and peat moss, with and without roofer. The growth and development of the seedlings was compared *in vitro* and *in vivo*. After 8 month of the starting of the experiments, the evaluated variables were: height of the plant, number and length of leaves, number and length of roots. Reflectance of the leaves was influenced by the contents of mineral salts as well as the concentrations of ANA in the culture medium. Besides, the chlorophile contents was quantified through the method of N-N Dimetilformamide and yje SPAD measurements of the leaves of different shades of Green. The experimental desing was completely random with four repetitions. Data were subjected to variance analysis complemented by the Tukey test at 5%. Results showed that the oak crust was the sustrate that favored the rooting and survival of seedlings in the acclimatization stage. Moreover, it was found a positive relationship between the chlorophile contents and the SPAD readings.

Keywords: *Laelia*, orchideae, SPAD, determination of chlorophile.

INTRODUCCIÓN

Aclimatación y aclimatización son términos que describen la adaptación de organismos a nuevos ambientes; el primero de ellos a un ambiente natural; mientras que, aclimatización se refiere a un ambiente es regulado por el hombre (Conover y Poole, 1984).

Durante el proceso de micropropagación de orquídeas la aclimatación es una etapa crítica, pues por múltiples factores, como las características morfofisiológicas propias de las vitroplántulas hasta el daño físico durante la manipulación, suele ocurrir que un número relativamente bajo de plántulas logran adaptarse a las nuevas condiciones ambientales (Torres *et al* 2006; Deb y Imchen 2010). Majada *et al.* (2000). Kadleček *et al.* (2001) han encontrado que las plántulas durante el período de aclimatación disminuyen su desarrollo y rendimiento fotosintético debido al cambio de las condiciones particulares de alta humedad relativa, baja intensidad luminosa y baja concentración de CO₂ en que se desarrolla el cultivo *in vitro* a las condiciones de invernadero. El entendimiento de la manera en que el ambiente de desarrollo *in vitro* y la aclimatación afectan la anatomía y la fisiología de las microplantas ayudará a reducir el porcentaje de plántulas que no se adaptan a las nuevas condiciones, por lo que este conocimiento es necesario para diseñar prácticas de manejo más eficaces (Torres *et al.*, 2006).

Se han diseñado diferentes enfoques para lograr con éxito la aclimatación de las plántulas micropropagadas, que van desde el cultivo *in vitro*, en los cuales se han probado diferentes medios de cultivo, así como el contenido de sales minerales, la concentración de agar y sacarosa en el medio, ya que tiene efecto en el desarrollo de la planta *ex vitro* (Deb e Imchen 2010), y en la coloración de los explantes, que está determinada por el contenido de clorofila. Además se han utilizado sustratos alternativos (Deb e Imchen 2010) y sistemas hidropónicos (Lopes da Silva, 2006) para lograr mayor porcentaje de éxito durante la aclimatación.

Durante la aclimatación de orquídeas se han realizado investigaciones para determinar los sustratos con los que se aumenta la supervivencia de *Euchile mariae* (Suárez Quijada *et al.* 2007), *Laelia speciosa* (Ávila-Díaz *et al.* 2009), *Cattleya maxima x nobilior* (Díaz *et al.* 2010), *Cattleya harrisoniana* y PUR *Laelia Purata* (Seidel y Augusto, 2011). Entre los sustratos más utilizados se encuentran los tallos triturados de helecho arborescente, corteza de árbol así como algunos musgos; sin embargo, el uso de estos materiales cada vez es más restringido por el daño ecológico que causa su extracción, por lo que se ha recurrido al uso de la fibra de coco, el polvo de coco (Colombo *et al.*, 2005, señalan que para la aclimatación de *Cattleya* el mayor porcentaje de sobrevivencia, hasta 98%, se encontró con polvo de coco mientras que únicamente 72% se logró con la turba), la corteza de pino, la fibra de palmas y de origen mineral existen algunos como la arcilla, la vermiculita, la grava (Demattê y Demattê, 1996; Kämpf, 2000). La característica física del sustrato determina la cantidad de agua que retiene, el pH, etc. que tiene relación con las condiciones ambientales, la especie y de tamaño plántula de orquídea que se desea aclimatar. (Cooke, 1999; Sorace *et al.*, 2007).

La orquídea *Laelia halbingeriana* es una especie endémica de Oaxaca considerada, según la legislación Mexicana, en la categoría de “especie amenazada” de la cual ya existe un protocolo de microporpagación (Raya *et al.*, 2009). Sin embargo, son pocos los estudios sobre su aclimatación por lo que el propósito del presente trabajo fue proponer un método de aclimatación considerando el tipo de sustrato, el tamaño de plántula y uso el de enraizador para su aclimatación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetativo

De las plántulas micropropagadas de *Laelia halbingeriana* 2.5 cm de altura aproximadamente con diferente tonalidad de verde; desde verde muy oscuro hasta verde claro.

Preparación de las plántulas

Las plántulas fueron retiradas de los frascos, se lavaron para eliminar el medio de cultivo adherido a las raíces, se colocaron en una solución fungicida a base de 0.6 g L^{-1} de benomyl durante aproximadamente 30 segundos y se eliminó el exceso de solución. Las plántulas se dividieron en dos lotes: uno de ellos se sembró en peat moss con y sin enraizador y el otro en corteza de encino con y sin enraizador que ambos sustratos habían sido previamente esterilizados en autoclave durante 17 minutos a $121 \text{ }^\circ\text{C}$. Se colocaron 50 plántulas en charolas de plástico de $24 \times 26 \text{ cm}$ por sustrato, utilizándose cuatro charolas por sustrato, éstas fueron transferidas al invernadero. Los riegos se efectuaron dependiendo de las necesidades de cada sustrato; sin embargo, cada 15 días se aplicó una solución bactericida a base de 6 g L^{-1} de Sulfato de estreptomicina, durante la permanencia de los explantes en los sustratos, con el objetivo de prevenir ataque por bacterias, así como fertilizante foliar en una concentración de 1 mL L^{-1} de Byfolan[®]

Variables evaluadas

Las variables respuesta fueron registradas: número de hojas, longitud de las hojas (cm), número de raíces, longitud de raíces (cm) y longitud del explante (cm) que fueron evaluados a los ocho meses después del trasplante a invernadero. La tasa de supervivencia se determinó contando las plántulas sobrevivientes, al final de la fecha de evaluación se

empleó un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones con arreglo factorial. Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de Tukey mediante el programa SAS (SAS 2002) versión 9.1.

Captura de imágenes digitales

Para la captura de las imágenes digitales se seleccionaron plántulas que provenían de la propagación *in vitro* desarrolladas tratamientos que contenían diferentes concentraciones uno de ellos con concentraciones de sacarosa de 58.43, 87.64 y 116.85 mM·litro⁻¹ y sales minerales MS al 50, 75, 100, 125 y 150 % de su concentración, y otro tratamiento con diferentes tipos y concentraciones de hormonas de ANA (0.0, 5.20, 7.80, 10.40 y 12.30 µM) con AIB (0.0, 4.94, 7.38, 9.84 y 12.30 µM).

Se construyó una caja de madera de 50 x 50 cm. En su interior se colocaron tres lámparas fluorescentes General Electric® de 76 µmol m⁻² s⁻¹, dos en un costado y posteriormente una en la parte superior, que iluminaron las plantas según el plano de captura de la imagen. Con una cámara Cannon® modelo EOS DIGITAL REBEL XT en modo manual. Se tomaron cinco imágenes digitales por tratamiento.

Espacios de color

Con el programa en Visual Basic v. 6.0® se obtuvieron los valores de los canales del modelo de color RGB de 32 fragmentos de 25 x 25 pixeles de cada tratamiento, seleccionados de las imágenes capturadas. A partir de este modelo se hicieron transformaciones al modelo CIE- XYZ (Poyton, 1996; 1999), requerido para obtener los espacios CIE-Lab (CIE, 1978; Robertson, 1977), Hunter-Lab (Konica Minolta, 2003).

Determinación de clorofila *a*, *b* y total con N, N-Dimetilformamida y SPAD

Con un medidor portátil de clorofila (MINOLTA SPAD 502) se obtuvieron lecturas SPAD de las plántulas con diferente tonalidad de verde por cada tratamiento. Para extraer y determinar el contenido de clorofila presente en las hojas, se tomaron 12 discos de cada una de las hojas, mediante una perforadora de 3 mm de diámetro que se colocaron en frascos color ámbar con 5 mL de N-N-Dimetilformamida y se almacenaron en oscuridad a 4 °C durante 24 horas. Después de este tiempo, se tomó una muestra de 3 mL de solvente y se colocó en una celda para medir su absorbancia en el espectofotómetro (JENWAY 6320D) utilizando el N, N-Dimetilformamida como blanco. Las longitudes de onda utilizadas y donde las clorofilas tienen un máximo de absorción fueron: 664 nm para la clorofila *a* y 647 nm para la clorofila *b*.

Los datos de absorbancia para cada una de las longitudes de onda se usaron para calcular la concentración de cada una de las clorofilas (*a*, *b* y total), para ello se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clorofila } a = 12.70 (A_{664}) - 2.79 (A_{647})$$

$$\text{Clorofila } b = 20.70 (A_{647}) - 4.62 (A_{664})$$

$$\text{Clorofila total} = 17.90 (A_{647}) + 8.08 (A_{664})$$

En donde A_{664} y A_{647} son los valores de absorbancia obtenidos en el espectofotómetro en cada una de las longitudes de onda. Los resultados obtenidos en cada una de las ecuaciones son los valores de la concentración de las diferentes clorofilas expresados en mg L^{-1} .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la etapa de aclimatación las plántulas de *L. halbingeriana* respondieron de forma diferente en la formación de órganos al ser trasplantadas en los diferentes sustratos (Cuadro 1). A los ocho meses de haber sido trasplantadas en corteza de encino el porcentaje de supervivencia fue hasta de 80 %, mientras que en peat moss solo se logró 40 % de supervivencia. Cabe destacar que el periodo de adaptación de las plántulas a las condiciones *ex vitro* fue de 8 semanas aunque la tasa de crecimiento fue muy lenta. A partir de esa fecha y hasta los ocho meses se nota un incremento en las variables estudiadas.

Cuadro 1. Efecto del sustrato en el número y longitud de hojas, número u longitud de raíces y longitud del explante.

Sustrato	Número de hojas	Longitud de hojas (cm)	Número de raíces	Longitud de raíces (cm)	Longitud del explante (cm)
Peat moss	4.51 b*	1.21 b	3.41 b	1.40 b	1.64 a
Corteza de encino	5.26 a	1.87 a	4.60 a	1.79 a	1.60 b
DMS	0.40	0.16	0.37	0.17	0.12

* Medias con la misma literal en cada columna son iguales estadísticamente (Tukey 0.05)

La aplicación de enraizador no influyó en el número y en la longitud de las hojas (Cuadro 2). Sin embargo, sí afectó la formación de raíces. La adición del enraizador promovió en 12 % la formación de raíces; la longitud de las raíces no mostró diferencias estadísticas significativas (Cuadro 2). En cuanto a la longitud de las plántulas la adición de

enraizador aumentó su tamaño (1.70 cm) comparado con las plántulas sin enraizador que solo alcanzaron en promedio 1.55 cm.

Cuadro 2. Efecto del enraizador en el número y longitud de hojas, número y longitud de raíces y longitud del explante.

Enraizador	Número de hojas	Longitud de hojas (cm)	Número de raíces	Longitud de raíces (cm)	Longitud del explante (cm)
Con enraizador	4.95 a*	1.60 a	4.23 a	1.63 a	1.70 a
Sin enraizador	4.85 a	1.47 a	3.78 b	1.57 a	1.55 b
DMS	0.40	0.17	0.38	0.16	0.12

* Medias con la misma literal en cada columna son iguales estadísticamente (Tukey 0.05)

Se observaron diferencias en el porcentaje de formación de hojas por efecto de la interacción entre el sustrato y la adición de enraizador. En el Cuadro 3 se muestra que en corteza de encino con enraizador se favoreció el número de hojas en promedio por planta (5.4), mientras que peat moss sin la aplicación de enraizador se reduce el número de hojas (4.5 en promedio).

La interacción que favoreció la longitud de las hojas fue la corteza de encino con el enraizador; mientras que las plántulas en el peat moss sin enraizador disminuyeron la longitud de las hojas en 41 % (Cuadro 3)

Cuadro 3. Efecto de la interacción entre el sustrato y el enraizador en el número y longitud de hojas, número y longitud de raíces y longitud del explante.

Sustrato y condición	Número de hojas	Longitud de hojas (cm)	Número de raíces	Longitud de raíces (cm)	Longitud de la plántula (cm)
Peat moss sin enraizador	4.50 b*	1.14 b	3.16 b	1.40 b	1.57 a
Peat moss con enraizador	5.13 ab	1.80 a	4.40 a	1.71 ab	1.52 a
Corteza de encino sin enraizador	4.53 b	1.27 b	3.67 b	1.40 b	1.72 a
Corteza de encino con enraizador	5.4 a	1.94 a	4.80 a	1.86 a	1.68 a
DMS	0.74	0.29	0.69	0.31	0.22

* Medias con la misma literal en cada columna son iguales estadísticamente (Tukey 0.05)

El proceso de rizogénesis estuvo más influenciado por la presencia o ausencia del enraizador que por el tipo de sustrato ya que estadísticamente estos tratamientos no

mostraron diferencias entre sí (Cuadro 3); La corteza de encino con enraizador presentó en promedio la mayor formación de raíces (4.80), mientras que en peat moss sin enraizador la formación de hojas disminuyó en 34 %. Un comportamiento similar se observó en la longitud de las raíces ya que la longitud mayor se obtuvo en corteza de encino con enraizador (1.80 cm en promedio), mientras que la menor longitud promedio se observó en los tratamientos sin enraizador (1.40 cm).

Imágenes digitales

La concentración de sales minerales en el medio de cultivo donde fue desarrollada *L. halbingeriana* influyó en la reflectancia de las hojas (Cuadro 4). Las hojas que se desarrollaron con 75 % de sales minerales reflejaron la mayor cantidad de luz en las bandas azul (B) y roja (R) y del mismo modo la mayor luminosidad (CIE-L) se observó con 75 % de sales minerales. El valor de HUE nos indica que entre más alta es la concentración de sales minerales en el medio mayor es la intensidad del color verde.

Cuadro 4. Efecto de la concentración de sales minerales del medio de cultivo en la reflectancia de las hojas de *L. halbingeriana* propagadas *in vitro*

Sales minerales (%) en el medio de cultivo	R	G	B	CIE- L	CIE-A	CIE-B	CRO M	HUE
50	93 ab*	101 ab	16 ab	40 ab	-15 a	42 ab	45 ab	109 b
75	101 a	109 a	21 a	43 a	-15 ab	44 a	46 a	109 b
100	65 c	78 b	11 b	31 b	-15 ab	35 c	38 b	114 a
125	70bc	85 ab	9 b	34 b	-17 b	38 abc	42 ab	114 a
150	68 c	83b	11 b	32 b	-16 ab	36 bc	40 ab	115 a
DMS	24.12	24.34	8.51	9.89	2.29	7.83	8.00	2.17

* Medias con la misma literal en cada columna son iguales estadísticamente (Tukey 0.05)

De manera general la concentración de azúcar en el medio de cultivo no influyó en la reflectancia ni luminosidad de las hojas desarrolladas *in vitro* (Cuadro 5). En el valor de HUE se puede observar que el menor contenido de azúcar propicia la coloración verde más intensa lo que se puede traducir en mayor contenido de clorofila.

Cuadro 5. Efecto de la concentración de azúcar en el medio de cultivo en la reflectancia de las hojas de *L. halbingeriana* propagadas *in vitro*

Azúcar mM·L ⁻¹	R	G	B	CIE- L	CIE-A	CIE- B	CRO M	THE	HUE
58.43	75 a *	89 a	13 a	35 a	-17 b	38 a	41 a	-66 a	114 a
87.64	82 a	92 a	13 a	36 a	-15 a	39 a	42 a	-68 b	111 b
116.85	81 a	93 a	13 a	37 a	-16 ab	40 a	43 a	-68 b	112 b
DMS	15.96	16.11	5.63	6.54	1.51	5.18	5.29	1.43	1.43

* Medias con la misma literal en cada columna son iguales estadísticamente (Tukey 0.05).

La concentración de ANA en el medio de cultivo influyó en la reflectancia de las hojas desarrolladas *in vitro*, las bandas de R y G del modelo de color RGB son las que presentaron diferencias estadísticas significativas en cuanto a la luz que reflejaron mientras que la luz azul no mostró diferencia (Cuadro 6). La menor cantidad de luz reflejada y la luminosidad de las hojas se observó en ausencia de ANA.

Cuadro 6. Efecto de la concentración de ANA en el medio de cultivo en la reflectancia de las hojas de *L. halbingeriana* propagadas *in vitro*

ANA $\mu\text{M L}^{-1}$	R	G	B	CIE-L	CIE-A	CIE-B	CROM	HUE
0.0	83 c*	94 c	15 a	37 c	-15 b	39 c	42 c	112 a
2.60	107 a	114 a	17 a	46 a	-15 b	47 a	49 a	108 b
7.80	93 abc	99 bc	16 a	40 bc	-13 a	42 bc	44 bc	108 b
10.40	99 ab	110 ab	18 a	44 ab	-16 b	45 ab	48 ab	110 a
13.0	86 bc	98 bc	14 a	39 bc	-16 b	42 bc	45 bc	112 a
DMS	13.87	13.55	6.08	5.40	1.37	4.12	4.17	1.59

* Medias con la misma literal en cada columna son iguales estadísticamente (Tukey 0.05).

El AIB influyó de manera diferente que el ANA en la reflectancia de las hojas desarrolladas *in vitro*, la concentración de 7.38 $\mu\text{M L}^{-1}$ de AIB presentó la menor cantidad de luz reflejada en las tres bandas del modelo de color RGB (Cuadro 7), sin embargo, en la estimación de la cantidad de clorofila por medio del HUE se obtiene que el contenido de clorofila aumenta en concentraciones de 7.38 $\mu\text{M L}^{-1}$ de AIB.

Cuadro 7. Efecto de la concentración de AIB en el medio de cultivo en la reflectancia de las hojas de *L. halbingeriana* propagadas *in vitro*

AIB $\mu\text{M L}^{-1}$	R	G	B	CIE- L	CIE-A	CIE-B	CROM	HUE
0.0	99 a *	108 a	18 a	43 a	-15 a	45 a	47 a	109 b
4.92	98 a	107 a	18 ab	43 a	-15 a	44 a	47 a	109 b
7.38	78 b	90 b	12 b	37 b	-15 a	39 b	42 b	112 a
9.84	89 ab	99 ab	15 ab	39 ab	-15 a	42 ab	45 ab	110 b
12.30	102 a	110 a	19 a	44 a	-15 a	45 a	48 a	109 b
DMS	13.87	13.55	6.08	5.40	1.37	4.12	4.17	1.59

* Medias con la misma literal en cada columna son iguales estadísticamente (Tukey 0.05)

Determinación de clorofila *a*, *b* y total

La concentración de clorofila extractable utilizando N,N-Dimetilformamida mostró valores mayores conforme aumentaron las unidades SPAD. En la Figura 1 se observa que el contenido de clorofila *a* en función de las unidades SPAD se ajustó a un modelo de regresión lineal. El incremento de cada lectura SPAD aumenta en 0.118 ml L^{-1} el contenido de clorofila *a* en el tejido vegetal

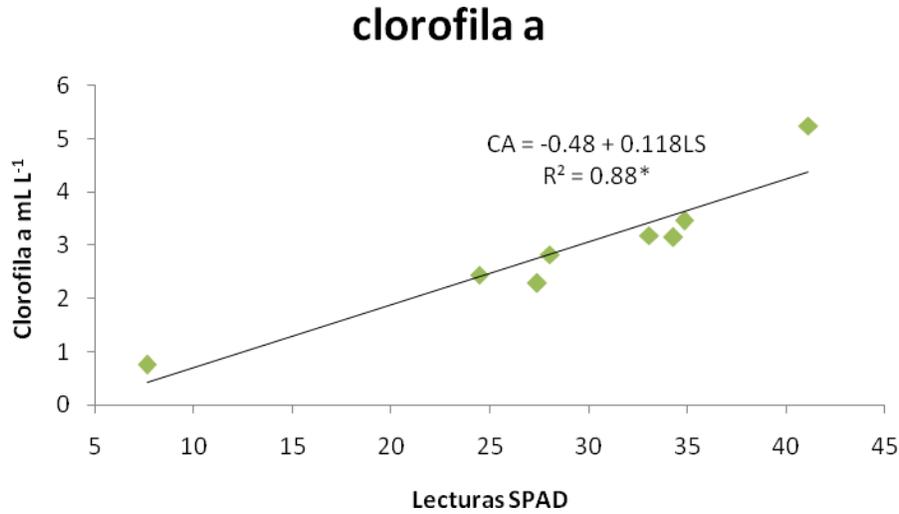


Figura 1. Correlación entre clorofila a extractable y unidades SPAD en plántulas de *L. halbingiana*

El contenido de clorofila b en función de las unidades SPAD se puede estimar con el modelo $CB=0.23+0.04LS+0.0005LS^2$, el cual presenta un coeficiente de determinación de $R^2=0.72$ (Figura 2).

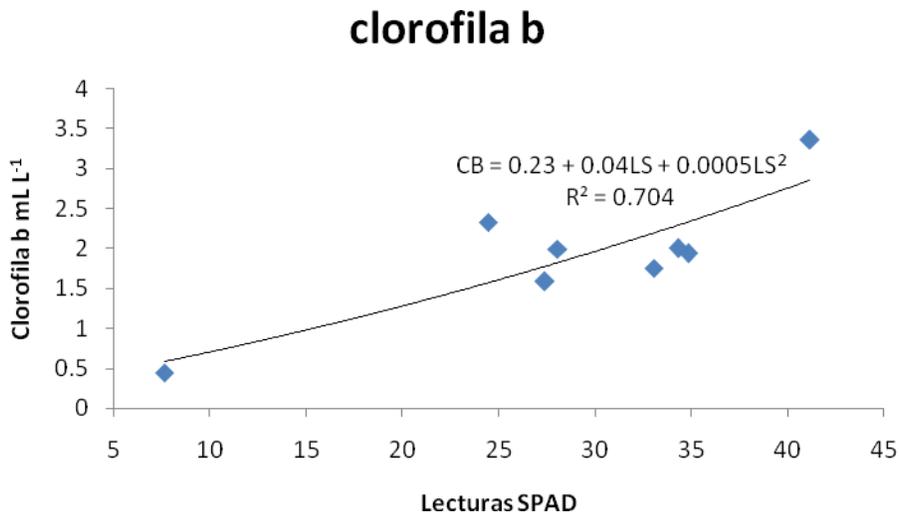


Figura 2. Correlación entre clorofila b extractable y unidades SPAD en plántulas de *L. halbingiana*

En la Figura 3 se observa que el contenido de clorofila total en función de las Lecturas SPAD se ajustó a un modelo de regresión lineal. El incremento de cada unidad SPAD aumenta en 0.492 ml L^{-1} el contenido de clorofila total en el tejido vegetal.

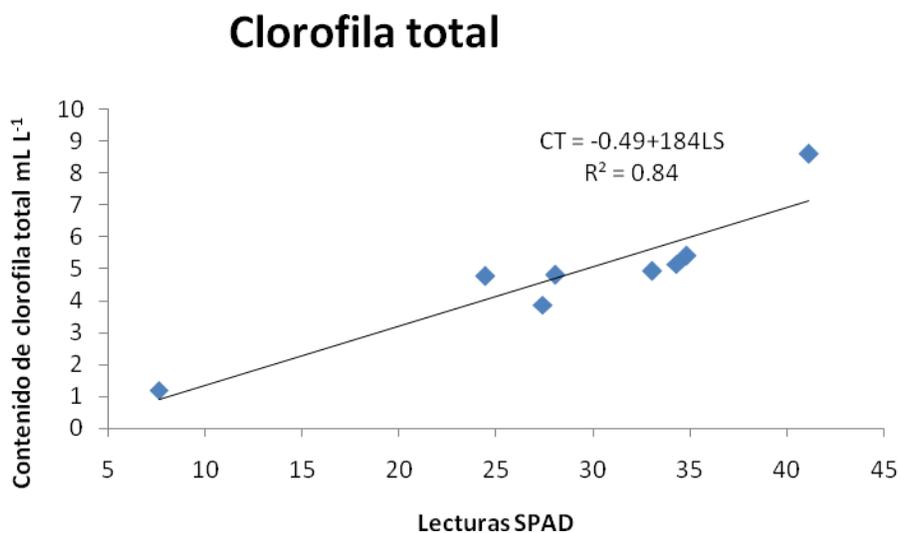


Figura 3. Correlación entre clorofila total extractable y unidades SPAD en plántulas de *L. halbingeriana*

La correlación positiva observada representa una ventaja ya que con las lecturas SPAD se puede sustituir el método tradicional sin tener que destruir la muestra además de que se ahorra tiempo al realizarla.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados de este trabajo, para la aclimatación de *Laelia halbingeriana* se concluye que:

La corteza de encino es el mejor sustrato para la aclimatación.

La concentración de sales minerales así como el ANA influyen en la reflectancia de las hojas

Mayor contenido de clorofila favorece la aclimatación.

LITERATURA CITADA

- Ávila, I.; Oyama, K.; Gómez, C.; Salgado, R. 2009. *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. Plant Cell Tiss Organ Cult. 99:335-336.
- Colombo, A. L.; Tadeu, F. R.; Marinho, A. A.; Batista, F. I. C. 2005. Aclimatização de um híbrido de *Cattleya* em substratos de origen vegetal sob dois sistemas de irrigação. Acta Scientiarum Agronomy. 27(1):145-150.
- Cooke, P. B. 1999. Estufas e telados. Revista Oficial da Orquidário, Rio de Janeiro. 13(3 y 4): 94-101.
- Conover, C. A.; Poole, R. T. 1984. Acclimatization of indoor foliage plants. Horticultural Review 6:119-154.
- Costa, A. M. M. 1998. Fisiologia da aclimatização. In: Tombolato, A. F.C.; Costa, A.M.M. (ed). Micropropagação de plantas ornamentais. Campinas: Instituto agrônômico p. 63-67.
- Deb, C. R.; Imchen, T. 2010. An efficient *In vitro* hardening technique of tissue culture raised plantas. Biotechnol. 1-5.
- Demattê, J. B. I.; Demattê, M. E. S. P. 1996. Estudos hídricos com substratos vegetais para cultivo de orquídeas epífitas. Pesq. Agropecu. Bras. Brasília. 31(11): 803-813.
- Díaz, L. P.; Namur, J.J.; Bollati, S. A.; Arce, A. 2010. Acclimatization of *Phalaenopsis* and *Cattleya* obtained by micropropagation. Revista Colombiana de Biotecnologia XII:27-40.
- Fabrit, A.; Sutter, E.; Dunston, SK. 1986. Anatomical changes in persistent leaves of tissue cultured strawberry plants after removal from culture. Scientia Horticulturae 28: 331-337.

- Grattapaglia, D.; Machado, M. A. 1990. Micropropagação. *In*: Torres, A. C.; Caldas, L. S. (Ed.). Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília, DF: ABCTP/Embrapa. P.99-170.
- Grout, B.W.W.; 1975. Wax development on leaf surfaces of *Brassica oleracea* var. currawong regenerated from meristem culture. *Plan Sci. Lett* 5:401-405.
- Kadleček, P.; Tichá, I.; Haisel D.Č.V. y Schäfer C., 2001. “Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth”. *Plant Science*, 161: 695-701.
- Kämpf, A. N. 2000. Produção comercial de plantas ornamentais. Guaíba, RS: Agropecuária. 254p
- López da Silva, A.L.; Henz, FET.; Horbach, M.A.; Walter, J.M. 2006. Aclimatização de mudas de *Cattleya tigrina* A. Rich. Ex Beer (orchidaceae) em sistema hidropônico. *Cuaderno de Pesquisa Sér Bio* 18:129-139.
- Majada, J.; Fal, M.; Tadeo, F.; Sánchez, R. 2000. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated Carnation. *Plan Cell, Tissue and Organ Culture*. 63:207-214.
- Marín, J. A., Gella, R.; Herrero, M. 1998. Stomatal structure and functioning as a response to environmental changes in acclimatized micropropagated *Prunus cerasus* L. *Annals of Botany* 62:663-670.
- Piccotino, D; Massai, R.; Dichio, B.; Unzo, V. 1997. Morphological and anatomical modifications induced by *in vitro* propagation of kiwifruit plants. *Acta horticulturae* 444: 127-132.

- Preece J., E., and E. Sutter. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field- In micropropagation: Technology and application Kluwer Academic Publishers. pp 71-93.
- Raya, M. Y. A.; Carrillo, C. G.; Pedraza, S. M. E.; Corona, T. T.; Carillo, S. J. A.; Alcantar, G.. G.. 2011. PROPAGACIÓN *in vitro* DE *Laelia halbingeriana*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 3: 539-553.
- Shackel, K. A.; Novello, V.; Sutter, E. G. 1990. Stomatal function and cuticular conductance in whole tissue-cultured apple shoots. Journal American Society Horticultural Science 115 (3): 468-472.
- SAS Institute 2003 SAS/STAT User's Guide Release 9.1 ed, Cary, NC, USA.
- Seidel, J. D.; Venturieri, A. G.; 2011. Ex vitro acclimatization of *Cattleya forbesii* and *Laelia purpurata* seedling in a selection of substrate. Acta Scient Agronomy, Maringá. 33:97-103.
- Souza, M. 2003. Muito além do xaxim. Natureza. São Paulo. 2: 32-37.
- Sorace, M.; Tadeu, F.R.; Yukari, L.Y.; Schnitzer, J.A.; Assari, L.S.T. 2007. Influence of auxin on acclimatization of *Oncidium baueri* (Orchidaceae). Semina: Ci Agrárias, Londrina. 28: 195-200.
- Suárez, Q.I., Sandoval Z.E., Hernández A.M. y Chávez, A.V.M., 2007. "Determinación histológica de regenerantes de *Euchile mariae* (Ames) Withner, (Orchidaceae) obtenidos a partir de protocolos cultivados *in vitro*". Lankesteriana, 7(1-2): 394-39.
- Torres, J.; Laskowski, L.; Sanabria, M.E. 2006. Efecto del ambiente de desarrollo sobre la anatomía de la epidermis foliar de *Cattleya jenmanii* Rolfe. Bioagro 18(2): 93-99.

DISCUSIÓN GENERAL

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Laelia halbingeriana*

Existen dos clases de marcadores genéticos: los morfológicos y los moleculares (Tanksley 1983). El uso de marcadores morfológicos en las plantas tiene muchas limitantes, pues su expresión puede estar sujeta a factores ambientales o fenológicos. Con frecuencia estos marcadores solo es posible evaluarlos a nivel de toda la planta y cuando esta llega a su estado adulto. Por otro lado, gracias a los avances en la biología molecular se han desarrollado métodos de identificación y caracterización basados en el uso de marcadores moleculares que superan, en la gran mayoría de los casos, las limitaciones de los métodos tradicionales. Estos marcadores moleculares son fenotípicamente neutros, presentan mayor segregación o polimorfismo que los morfológicos, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal. Dentro de los marcadores moleculares se menciona la existencia de dos tipos: las proteínas (principalmente las isoenzimas) y los marcadores de ADN. Los marcadores del ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos. Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante (Karp y Edwards 1998). Algunos ejemplos de ellos son: Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD), Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), Microsatélites o Secuencias simples repetidas (SSR), Amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites (RAMPO) etc. (Rallo *et al.* 2002).

El género *Laelia*, con un total de once especies, es endémico de nuestro país, y se encuentra en una gran variedad de nichos ecológicos. La diversidad genética que se presenta en las poblaciones naturales permite entender cómo es que las especies se adaptan y evolucionan, entre los principales factores de la variabilidad genética están la distribución geográfica, los sistemas de reproducción, las formas de vida y las características de dispersión del polen y de las semillas; todos estos influyen fuertemente en la estructura genética de las poblaciones naturales de plantas. *Laelia halbingeriana* es una especie endémica de Oaxaca la cual es considerada como híbrido natural entre *L. anceps* y *L. superbiens*. Al realizar la caracterización molecular de *L. halbingeriana* se encontró 60.97 % de polimorfismo en promedio y el dendrograma obtenido con los marcadores tipo RAPD definió grupos entre las especies estudiadas. Los marcadores moleculares permitieron identificar por sus patrones RAPD a las 4 especies de *Laelia*, las cuales presentaron un patrón de bandeo diferente, obteniéndose con ello su huella genética. La variabilidad genética existente entre las cuatro especies de *Laelia* denota un mayor grado de parentesco entre las especies de *L. halbingeriana*, *L. anceps* y *L. superbiens* que con *L. autumnalis*. Lo que demostró que el uso de marcadores moleculares RAPD permite identificar polimorfismos inter e intraespecífico, por lo que los resultados obtenidos son de gran utilidad debido a que ayudarán a explicar la diversidad de las orquídeas mexicanas.

NÚMERO CROMOSÓMICO DE *Laelia halbingeriana*

La familia *Orchidaceae* presenta una gran variación en el número cromosómico (Félix y Guerra 2010; Daviña *et al.*, 2009). Esta familia está integrada por aproximadamente 800 géneros con 1500 especies (Dole 2004). El género *Laelia* cuenta con 11 especies (White, 1996; Lee *et al.*, 2007) de las cuales se han reportado un número cromosómico variable desde $2n=20$ (Félix y Guerra, 2010) hasta $2n=60$ (Kamemoto, 1950). El número cromosómico determinado en *L. halbingeriana* puede deberse a su aislamiento geográfico o porque es una especie única y endémica de una región de la cañada de Oaxaca. Estos resultados contribuyen a la caracterización de *L. halbingeriana*, al utilizar como criterio el número cromosómico, resultado que es importante ya que pocas especies de orquídeas han sido caracterizadas de esta manera.

PROPAGACIÓN *in vitro* de *Laelia halbingeriana*

Se logró establecer un método práctico para la propagación *in vitro* de *L. halbingeriana*, al relacionar los incrementos de las plántulas en los diferentes tratamientos, se observó que para la etapa de multiplicación la influencia de BA ($2.22 \mu\text{M L}^{-1}$) promueve el desarrollo de hojas coincidiendo estos resultados con los de Suárez-Quijada *et al.* (2010) quienes señalan que el BA en el medio de cultivo tiene mayor influencia que el ANA en la etapa de multiplicación *in vitro* de *Euchile mariae*. La concentración de sales minerales y de azúcar no son factores que afecten la organogénesis *in vitro* de *L. halbingeriana*, sin embargo Romero-Tirado *et al.* (2007) señalan que al utilizar sales minerales a 50 y 100 % de su concentración se obtiene mayor cantidad de plántulas desarrolladas *in vitro* de *L. anceps*. Para el enraizamiento *in vitro* la adición de ANA ($5.2 \mu\text{M L}^{-1}$) permite mayor desarrollo radical, lo que coincide con Pardo *et al.*, (2008), en el número de brotes en *Billbergia rosea* se incrementa (8.95) con $1.0 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$ concentración de ANA.

DETERMINACIÓN DE CLOROFILA DURANTE LA ACLIMATACIÓN DE *Laelia halbingeriana*

Por otra parte, se encontraron correlaciones positivas entre el contenido de clorofila a, b y total y las lecturas SPAD. El aumento en la concentración de clorofila se traduce en incremento de fotosíntesis que conduce a la producción de alimentos que la planta necesita para sobrevivir a las condiciones de invernadero por lo que esta correlación positiva observada representa una ventaja ya que con las lecturas SPAD se puede sustituir el método tradicional sin tener que destruir la muestra además de que se ahorra tiempo al realizarla.