



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

CAMPUS CÓRDOBA

POSTGRADO EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE

**GERMINACIÓN *IN VITRO*, DESARROLLO DE PLÁNTULAS EN BIG Y
ACLIATIZACIÓN DE *Lycaste aromatica* (Graham) Lindl.**

FLOR YARUMI SOLÍS ZANOTELLI

TESIS

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

MAESTRA EN CIENCIAS

AMATLÁN DE LOS REYES, VERACRUZ, MÉXICO

DICIEMBRE 2017

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS
REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, la que suscribe Flor Yarumi Solís Zanotelli, alumna de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección de la profesora Dra. Obdulia Baltazar Bernal, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Germinación *in vitro*, desarrollo de plántulas en BIG y aclimatización de *Lycaste aromatica* (Graham) Lindl.

Y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Profesor Consejero(a) o Director(a) de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Amatlán de los Reyes, Veracruz a 21 de noviembre de 2017.



Firma



Dra. Obdulia Baltazar Bernal
Vo.Bo. de la Directora de Tesis

La presente tesis, titulada: **Germinación *in vitro*, desarrollo de plántulas en BIG y aclimatización de *Lycaste aromatica* (Graham) Lindl**, realizada por la alumna: **Flor Yarumi Solís Zanotelli**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: 
DR. JUAN ANTONIO PÉREZ SATO

DIRECTORA: 
DRA. OBDULIA BALTAZAR BERNAL

ASESOR: 
DR. JUAN VALENTE HIDALGO CONTRERAS

Amatlán de los Reyes, Veracruz, México, diciembre 2017.

GERMINACIÓN *IN VITRO*, DESARROLLO DE PLÁNTULAS EN BIG Y ACLIMATIZACIÓN DE *Lycaste aromatica* (Graham) Lindl.

Flor Yarumi Solís Zanotelli, MC

Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue la germinación de semillas *in vitro*, el desarrollo de plántulas en un sistema de biorreactores de inmersión por gravedad (BIG) y la aclimatización de *Lycaste aromatica* (Graham) Lindl. Se examinaron medios de cultivo para la germinación *in vitro*: ½ Murashige y Skoog (MS), MS, ½ Knudson C (KC) y KC, se comparó el sistema de propagación *in vitro* semisólido con cuatro frecuencias de inmersión de BIG en medio MS y el efecto del sistema de propagación *in vitro* (medio semisólido y BIG), sustratos (peat moss Premier® y musgo sphagnum chileno) y fungicidas (PHC T-22®, Captan Plus® y Ridomil Bravo® 81) sobre la aclimatización. La germinación inició a las 8 semanas y en el tratamiento ½ MS se obtuvieron 27 semillas. En el BIG los datos más altos fueron, 10 hojas, 4.7 raíces y 5.4 cm de altura. Sin embargo, las plántulas en MS semisólido obtuvieron un mayor número de brotes (1.6 brotes) y longitud de raíz (2 cm), además el MS líquido mostró la mayor tasa de fotosíntesis ($0.740 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). En la aclimatización se obtuvo una supervivencia del 83 al 100% en los tratamientos del semisólido y de BIG en el sustrato de musgo sphagnum chileno. Los mejores tratamientos fueron BIG en musgo sphagnum chileno más PHC T-22® con 6.8 cm de altura, semisólido en peat moss Premier® más PHC T-22® con 6 hojas, semisólido en peat moss Premier® con 3 brotes y semisólido en peat moss Premier® más Captan Plus® con 0.43 mg g^{-1} de contenido de clorofila total.. El fungicida biológico tuvo un control similar al sistémico.

Palabras clave: germinación asimbiótica, semisólido, orquídea, sphagnum, *Trichoderma harzianum*

**IN VITRO GERMINATION, DEVELOPMENT OF PLANTLETS IN BIG AND
ACCLIMATIZATION OF *Lycaste aromatica* (Graham) Lindl.**

Flor Yarumi Solís Zanotelli, MC

Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

The objective of the work was the germination of seeds *in vitro*, the development of plantlets in a system of bioreactors of immersion by gravity (BIG) and the acclimatization of *Lycaste aromatica* (Graham) Lindl. Culture media for *in vitro* germination were examined: ½ Murashige and Skoog (MS), MS, ½ Knudson C (KC), KC, the *in vitro* propagation system was compared using semi-solid and four BIG immersion frequencies in MS medium and the effect of the *in vitro* propagation system (semi-solid medium and BIG), substrates (peat moss Premier® and chilean sphagnum moss) and fungicides (PHC T-22®, Captan Plus® and Ridomil Bravo® 81) on the acclimatization. Germination started at 8 weeks and in the treatment, ½ MS was 27 seeds. In the BIG the highest data were 10 leaves, 4.7 roots and 5.4 cm in height. However, the plantlets in the semi-solid MS obtained a greater number of shoots (1.6 shoots) and root length (2 cm), in addition the liquid MS showed the highest rate of photosynthesis (0.740 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹). In the acclimatization, a survival of 83 to 100% was obtained in the semi-solid treatments and in the BIG in the chilean sphagnum moss substrate. The best treatments were BIG in the chilean sphagnum moss plus PHC T-22® with 6.8 cm height, semi-solid in moss Premier® plus PHC T-22® with 6 leaves, semisolid in peat moss Premier® with 3 buds and semi-solid in moss Premier® plus Captan Plus® with 0.43 mg g⁻¹ total chlorophyll content. The biological fungicide had a similar control to the systemic one.

Keywords: asymbiotic germination, semisolid, orchid, sphagnum, *Trichoderma harzianum*

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme llegar a la culminación de un ciclo más de vida y por impulsarme en los momentos en que lo necesitaba. Por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido valiosas en mi vida.

A mis padres, Juan de Dios Solís Barojas y Catalina Zanotelli Garcilazo, quienes me han apoyado en cada una de mis decisiones, por tener siempre las palabras adecuadas que me reconfortan y gracias a sus enseñanzas de vida construyo día a día un camino de triunfos y logros.

Al amor de mi vida, mi hija Katherine que ha alegrado cada instante de este proceso, por su paciencia y madurez para entender las cosas y porque es mi impulso para seguir adelante y por quien seré una mejor profesionista y madre cada día.

A mi hermano Gerardo por su apoyo en todo momento, por ser mi amigo y cuidarme siempre.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca que me otorgó para el desarrollo de mi proyecto de maestría.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba y a su laboratorio de Cultivo de Tejidos por abrir las puertas de sus instalaciones para el desarrollo de mi proyecto.

A la Línea de Generación y/o Aplicación del Conocimiento (LGAC), Eficiencia y Sustentabilidad en la Producción Primaria en Sistemas Agroalimentarios del Programa de Postgrado de la Maestría en Ciencias en Innovación Agroalimentaria Sustentable del Colegio de Postgraduados del Campus Córdoba.

A la Microrregión de Atención Prioritaria Chocamán, por su gran apoyo en la aportación del germoplasma para esta investigación.

A la Dra. Obdulia Baltazar Bernal, por ser la base de mi formación, por su amistad y dirección en la realización de este proyecto.

Al Dr. Juan Antonio Pérez Sato, por su gran apoyo y colaboración a lo largo de la maestría.

Al Dr. Juan Valente Hidalgo Contreras, por sus consejos, orientación y por su valiosa contribución en esta investigación.

Al biólogo Octavio Sánchez Eugenio, por su colaboración e información brindada durante la realización del proyecto.

A todas las personas, compañeros y amigos que de alguna forma me apoyaron durante el proceso de la maestría.

CONTENIDO

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| RESUMEN | iv |
| ABSTRACT | v |
| CONTENIDO..... | viii |
| INTRODUCCIÓN GENERAL..... | 1 |
| 1. Justificación..... | 1 |
| 2. Hipótesis..... | 2 |
| 3. Objetivos | 2 |
| 4. Revisión de literatura..... | 4 |
| 4.1 <i>Orchidacea</i> | 4 |
| 4.2 <i>Lycaste</i> | 4 |
| 4.3 <i>Lycaste aromatica</i> | 5 |
| 4.4 Germinación de orquídeas..... | 7 |
| 4.5 Biorreactores de inmersión temporal | 7 |
| 4.6 Aclimatización | 8 |
| 5. Literatura citada..... | 10 |
| CAPITULO 1. Germinación <i>in vitro</i> y desarrollo de <i>Lycaste aromatica</i> (Graham) Lindl en biorreactor de inmersión por gravedad..... | 18 |
| 1.1 Introducción | 20 |
| 1.2 Materiales y métodos | 21 |
| 1.2.1 Material vegetal | 21 |
| 1.2.2 Medios de cultivo | 21 |
| 1.2.3 Germinación <i>in vitro</i> | 22 |
| 1.2.4 Desarrollo de plántulas | 23 |
| 1.2.5 Variables evaluadas y análisis estadístico | 23 |
| 1.3 Resultados..... | 26 |
| 1.3.1 Germinación <i>in vitro</i> | 26 |
| 1.3.2 Desarrollo de plántulas <i>in vitro</i> | 27 |
| 1.4 Discusión | 34 |
| 1.4.1 Germinación <i>in vitro</i> | 34 |
| 1.4.2 Desarrollo de plántulas <i>in vitro</i> | 34 |
| 1.5 Conclusiones..... | 37 |
| 1.6 Literatura citada..... | 38 |
| CAPÍTULO 2. Sustratos y fungicidas en la aclimatización de <i>Lycaste aromatica</i> (Graham) Lindl. | 44 |

| | | |
|-------|--------------------------------------------------|----|
| 2.1 | Introducción | 46 |
| 2.2 | Materiales y métodos | 48 |
| 2.2.1 | Material vegetal | 48 |
| 2.2.2 | Aclimatización de plántulas | 49 |
| 2.2.3 | VARIABLES EVALUADAS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 50 |
| 2.3 | Resultados y discusión..... | 51 |
| 2.4 | Conclusiones..... | 58 |
| 2.5 | Literatura citada | 59 |
| 6. | Conclusiones y recomendaciones generales..... | 64 |

LISTA DE CUADROS

| | | |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Cuadro 1. | Medios de cultivo para la germinación de semillas de <i>Lycaste aromatica</i> (Graham) Lindl..... | 22 |
| Cuadro 2. | Tratamientos para el desarrollo de plántulas de <i>Lycaste aromatica</i> (Graham) Lindl | 23 |
| Cuadro 3. | Efecto del medio de cultivo sobre la germinación in vitro de <i>Lycaste aromatica</i> en promedio de 6 semanas | 26 |
| Cuadro 4. | Efecto del sistema de cultivo y la frecuencia de inmersión sobre el desarrollo in vitro de <i>Lycaste aromatica</i> | 29 |
| Cuadro 5. | Índice y caracterización estomática del envés de la hoja de <i>L. aromatica</i> | 30 |
| Cuadro 6. | Índice y caracterización estomática del haz de la hoja de <i>L. aromatica</i> | 30 |
| Cuadro 7. | Efecto del sistema de micropropagación sobre el intercambio de CO ₂ y la fotosíntesis..... | 32 |
| Cuadro 8. | Efecto del medio de cultivo sobre la fotosíntesis e intercambio de CO ₂ | 33 |
| Cuadro 9. | Concentración de clorofila en plántulas de <i>Lycaste aromatica</i> (Graham) Lind después de 16 semanas de desarrollo in vitro | 33 |
| Cuadro 10. | Tratamientos para la aclimatización de <i>L. aromatica</i> | 49 |
| Cuadro 11. | Efecto promedio de los tratamientos en la aclimatización de <i>Lycaste aromatica</i> (Graham) Lind a las 6 semanas | 53 |
| Cuadro 12. | Concentración de clorofila de plántulas de <i>L. aromatica</i> (Graham) Lind después de 6 semanas de aclimatización en el invernadero..... | 57 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Planta de <i>L. aromatica</i> (Graham) Lindl. cultivada y adaptada a un huerto de traspatio | 4 |
| Figura 2. Flor de <i>L. aromatica</i> (Graham) Lindl..... | 5 |
| Figura 3. Aspecto físico de la planta de <i>L. aromatica</i> (Graham) Lindl. durante su periodo seco..... | 6 |
| Figura 4. Comportamiento del número de semillas germinadas de <i>Lycaste aromatica</i> desarrolladas en cuatro diferentes medios de cultivo durante seis semanas | 27 |
| Figura 5. Morfología de las plántulas de <i>L. aromatica</i> (Graham) Lindl. en los tratamientos | 28 |
| Figura 6. Estomas de la hoja de <i>L. aromatica</i> (Graham) Lindl. | 31 |
| Figura 7. Supervivencia de plántulas de <i>Lycaste aromatica</i> (Graham) Lind durante 6 semanas. | 55 |

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Justificación

La población de las orquídeas está afectada por la perturbación de su hábitat, lo cual limita la cantidad de recursos naturales que se invierten en la atracción de polinizadores, un ejemplo de ello es *Lycaste aromatica*, que solo un 8-11% de las flores forma capsulas en su hábitat natural (Hietz *et al.*, 2006) y no hay reportes sobre la germinación. Por otra parte, por su agradable aroma a canela es considerada entre las orquídeas más saqueadas del bosque mesófilo de montaña para su venta ilegal en los mercados de la región a un precio muy bajo que varía entre \$10.00 a \$50.00.

La germinación en el hábitat natural con bacterias y las hifas fúngicas naturales del suelo es del 30% sin desarrollarse más allá del punto de ruptura de la testa (Rasmussen and Whigham, 1993), el uso de hongos micorrízicos en condiciones de campo es favorable para la germinación de orquídeas (Wang *et al.*, 2011) y con las técnicas *in vitro* el porcentaje es de 50-75% en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962) (Gutiérrez-Miceli *et al.*, 2008; Hossain, 2008; Hossain *et al.*, 2010) y del 85% en el medio $\frac{1}{2}$ MS (Ferreira *et al.*, 2017).

El uso de medios líquidos puede causar la hiperhidricidad y en los sistemas de inmersión temporal se puede evitar este problema por la frecuencia de inmersión (Etienne and Berthouly, 2002). El sistema de doble frascos o biorreactor de inmersión temporal (TIB), permite la inmersión temporal de los explantes (Escalona *et al.*, 1999). El Biorreactor de Inmersión por Gravedad (BIG) es menos costoso que el RITA® y se ha utilizado para la propagación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks) (Ramírez-Mosqueda and Iglesias-Andreu, 2016) y café (Ducos *et al.*, 2007).

Las plántulas desarrolladas en biorreactor son menos susceptibles a sobrevivir durante la aclimatización, la cual es la etapa final de un protocolo de micropropagación, que consiste en la adaptación de las plántulas antes de pasar al invernadero o un ambiente natural (Rabaiolli *et al.*, 2017). Esta etapa es crucial porque un alto porcentaje de esas plantas micropropagadas no sobreviven a este período (Mengarda *et al.*, 2017; Moreira *et al.*, 2013). Con base en lo anterior se plantearon las siguientes hipótesis.

2. Hipótesis

- Las semillas germinadas en el medio de cultivo $\frac{1}{2}$ MS tendrán un porcentaje de germinación más alto que en el medio MS al 100%, $\frac{1}{2}$ Knudson C y Knudson C
- Las plántulas en Biorreactor de Inmersión por Gravedad tendrán un mayor desarrollo en algunas de las frecuencias de inmersión que en el medio semisólido
- Las plántulas provenientes de Biorreactor de Inmersión por Gravedad tendrán un mejor desarrollo y sobrevivencia en el sustrato de musgo Spagnum adicionado con un fungicida
- El fungicida PHC T-22 ® tendrá el mismo efecto en la sobrevivencia y desarrollo que Captan Plus® y Ridomil Bravo ®81

3. Objetivos

Objetivo general

- Germinar *in vitro*, desarrollar en Biorreactor de Inmersión por Gravedad y aclimatizar plántulas de *Lycaste aromatica* (Graham) Lindl

Objetivos particulares

- Evaluar cuatro medios de cultivo para germinar semillas *in vitro* de *Lycaste aromatica* (Graham) Lindl
- Desarrollar plántulas en cuatro frecuencias de inmersión en Biorreactor de Inmersión por Gravedad y en el método semisólido
- Evaluar las plántulas desarrolladas en Biorreactor de Inmersión por Gravedad y en el método de semisólido durante el proceso de aclimatización en el invernadero utilizando diferentes sustratos y fungicidas
- Evaluar el fungicida PHC T-22 ®, Captan Plus® y Ridomil Bravo ®81 sobre la supervivencia de las plántulas

4. Revisión de literatura

4.1 *Orchidaceae*

La familia *Orchidaceae* es una de las más grandes dentro de las plantas que producen flores con aproximadamente 20,000-30,000 especies en el mundo (Hágsater *et al.*, 2005). En México se localizan unas 1,254 especies (Soto Arenas *et al.*, 2007) de las cuales 433 se encuentran en Veracruz (Castañeda-Zárate *et al.*, 2012) y en la comunidad de Tepexilotla reportan entre 19 (Baltazar Bernal *et al.*, 2014) y 34 especies de orquídeas (Tejeda *et al.*, 2013).

4.2 *Lycaste*

El género *Lycaste* contiene alrededor de 36 especies que se distribuyen desde México hasta el sur de Brasil. Entre las especies de este género con un gran valor ornamental se distinguen *L. skinneri*, por el gran tamaño de sus flores y *L. aromatica* (Graham) Lindl., por la fragancia de canela de sus flores (Mata-Rosas *et al.*, 2010), que las vuelven atractivas para la extracción ilegal en su hábitat natural (Figura 1).



Figura 1. Planta de *L. aromatica* (Graham) Lindl., cultivada y adaptada a un huerto de traspatio

4.3 *Lycaste aromatica*

La orquídea *Lycaste aromatica* (Graham) Lindl. es una herbácea epífita de tamaño medio y crecimiento simpodial, caducifolia en invierno y exponiendo en lo alto de los pseudobulbos ovados, comprimidos y acanalados (Scheffknecht *et al.*, 2010) unas fuertes espinas de 3-5 mm de largo (Fowlie, 1970). Las hojas son lanceoladas, anchas, acanaladas y acuminadas (Fowlie, 1970) y las flores son triangulares y amarillas de aroma a canela (Figura 2), florece a fines de primavera-verano con 16 flores por inflorescencia (Pridgeon, 1992).



Figura 2. Flor de *L. aromatica* (Graham) Lindl.

Las plantas de *L. aromatica* (Graham) Lindl. sufren un marcado ciclo anual en su crecimiento; requieren un periodo seco (invierno y principios de primavera) que alterna con otro húmedo (Mata-Rosas *et al.*, 2010) (Figura 3). Tomando en cuenta la producción regular de pseudobulbos, estas plantas llegan a su etapa fértil a los 10 años y alcanzan su tamaño completo a los 20 años aproximadamente (Winkler and Hietz, 2001).



Figura 3. Aspecto físico de la planta de *L. aromatica* (Graham) Lindl., durante su periodo seco

En la república mexicana, los hábitats naturales de esta especie incluye bosques de robles templados, selvas tropicales de alta elevación y bosques de neblina de selva lluviosa de montaña (Hágsater *et al.*, 2005).

En México, existe un gran interés y preocupación en la propagación y la conservación de las poblaciones de *L. aromatica* (Graham) Lindl., debido al aumento de la extracción ilegal de su hábitat natural para la venta en mercados regionales, por lo que se han realizado diversas investigaciones para mitigar este problema, por ejemplo, el estudio sobre la estructura de su población (Winkler and Hietz, 2001), la tasa de herbivoría a nivel comunitario (Winkler *et al.*, 2005) y la dinámica poblacional en un contexto de metapoblación en un bosque húmedo de montaña (Winkler *et al.*, 2009). También se ha estudiado la adaptación de plántulas en un bosque y en plantaciones de café, donde la mayor adaptación y menor mortalidad se da en los bosques, lo que puede explicar la ausencia de *L. aromatica* (Graham) Lindl en cafetales (Scheffknecht *et al.*, 2010). En otro trabajo desarrollaron el protocolo para la propagación *in*

in vitro de secciones basales y apicales de pseudobulbos en medio MS adicionando la citoquinina tidiazurón (TDZ) (Mata-Rosas *et al.*, 2010). Sin embargo, en el área de micropropagación aún hay más temas por estudiar, entre ellos desarrollar un método de propagación de semillas eficiente y ecológicamente viable para esta especie.

4.4 Germinación de orquídeas

Las tasas de germinación de las orquídeas son muy bajas por tener una semilla demasiado pequeña. En su hábitat natural la germinación es del 5% (Rasmussen and Whigham, 1993), pero cuando se realiza *in situ* con la aplicación de micorrizas aumenta al 20% (Wang *et al.*, 2011) y al utilizar los métodos *in vitro* la germinación puede ser del 50-75% en el medio MS (Gutiérrez-Miceli *et al.*, 2008; Hossain, 2008; Hossain *et al.*, 2010).

La germinación asimbiótica de semillas de orquídeas se ha utilizado para la producción de orquídeas con potencial ornamental como *Aerides ringens* (Lindl.) (Srivastava *et al.*, 2015), *Calopogon tuberosus* var. *tuberosus* (Kauth *et al.*, 2006) y *Epidendrum ibaguense* Kunth (Hossain, 2008) y ha demostrado ser una herramienta eficiente para la producción de orquídeas con fines de conservación y reintroducción (Dutra *et al.*, 2008; Stewart and Kane, 2006).

4.5 Biorreactores de inmersión temporal

El sistemas de inmersión temporal (SIT) es el cultivo de células, tejidos u órganos expuestos temporalmente a medio de cultivo líquido en biorreactores semiautomatizados bajo condiciones axénicas y controladas (Bello-Bello *et al.* 2014). El interés en el uso de SIT ha aumentado durante la última década (Aragón *et al.*, 2014) y ha garantizado un mejor desarrollo de las plántulas (Aragón *et al.*, 2014; Cabrera *et al.*, 2011; Latawa *et al.*, 2015; Ramírez-Mosqueda and Iglesias-Andreu, 2016; Ramos-Castellá *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2016) en comparación con el medio semisólido. Sin embargo, los sistemas convencionales

de micropropagación que utilizan medio semisólido son todavía ampliamente utilizados para el desarrollo de plántulas de orquídeas (Dutra *et al.*, 2008; Kalimuthu *et al.*, 2007; Quiroz *et al.*, 2017; Rabaiolli *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2015; Srivastava *et al.*, 2015).

Los Biorreactores de Inmersión por Gravedad (BIG) son un par de sistemas basados en el uso de contenedores gemelos y han demostrado ser muy útiles. Su funcionamiento consiste en el uso de una sola válvula de solenoide para el suministro de aire y el medio se devuelve a otro contenedor por gravedad (Ducos *et al.*, 2007). A diferencia de RITA®, el BIG es menos costoso y se ha utilizado en vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks) (Ramírez-Mosqueda and Iglesias-Andreu, 2016) y café (Ducos *et al.*, 2007).

4.6 Aclimatización

La aclimatización es la etapa final de un protocolo de micropropagación, que consiste en la adaptación de las plántulas antes de pasar al invernadero o un ambiente natural (Rabaiolli *et al.*, 2017). Las plántulas *in vitro* se desarrollan en condiciones controladas de baja intensidad luminosa, alta humedad relativa y bajo intercambio de CO₂ y O₂. Es bien conocido que al transferir las plántulas de *in vitro* a condiciones *ex vitro*, generalmente hay una disminución de su tasa fotosintética (Debergh and Zimmerman, 2012) y un alto porcentaje de esas plantas micropropagadas no sobreviven al período de aclimatización (Mengarda *et al.*, 2017; Moreira *et al.*, 2013).

El sustrato para orquídeas debe propiciar las condiciones físicas (como porosidad, aireación, drenaje y retención de agua), al mismo tiempo que debe garantizar las condiciones químicas y biológicas necesarias para el desarrollo de las plántulas (Macedo *et al.*, 2014). El musgo rubio *Sphagnum* en su hábitat natural conserva la humedad durante largos periodos, a pesar de estar en sitios escarpados, pues en el crecen abundantes orquídeas (Hágsater *et al.*, 2005). El sustrato *Sphagnum* es el más utilizado en la aclimatización de plantas producidas *in vitro*,

porque tiene una mayor retención de agua y una textura esponjosa, que evitan daños en el sistema radicular de las plántulas (Macedo *et al.*, 2014).

Por ejemplo, se ha reportado un 100% de supervivencia en plántulas de *Phalaenopsis amabilis* (Venturieri and Arbieto, 2011) con sustrato de *Sphagnum*. Otro experimento reportó que al usar musgo *Sphagnum* se alcanzó un porcentaje de supervivencia del 38% con *Cattleya guttata* y del 60% con *Zygopetalum mackayi* (Manhães *et al.*, 2015). Gutierrez-Miceli *et al.* (2008) reportaron en plántulas de *Guarianthe skinnerii* un 79% de supervivencia, con el sustrato de turba peat moss inoculado con *Trichoderma harzianum* y en semillas de *Spathoglottis plicata* Blume al inocularlas con el hongo *Epulorhiza* favoreció su germinación simbiótica (Aewsakul *et al.*, 2013). Se reportó que el sustrato peat moss contiene 425 mg kg⁻¹ de fósforo (P), 22.5 meq/100 g de calcio (Ca), 200 mg kg⁻¹ de amonio (NH₄) y 150 mg kg⁻¹ de nitrato (NO₃) de contenido nutrimental (Scagel, 2003).

Para obtener un mayor porcentaje de sobrevivencia de plántulas, durante la aclimatización, se utilizan fungicidas químicos de contacto como el Captan 50 Plus® (Captan N- (triclorometiltio) ciclohex-4-en-1,2-dicarboximida) y sistémicos como el Ridomil Bravo® 81 (Metalaxil-M: (R)-2-[(2,6-dimetil-fenil)- metoxiacetilamino]-ácido propiónico metil éster) o fungicidas biológicos como el PHC T-22® (*Trichoderma harzianum* cepa T-22 KRL-AG2). Venturieri y Arbieto (2011) reportaron que en plántulas de *Phalaenopsis amabilis* la supervivencia fue favorecida por el fungicida Manzate 800®.

5. Literatura citada

- Aewsakul, N., Maneesorn, D., Serivichyaswat, P., Taluengjit, A., and Nontachaiyapoom, S. (2013). Ex vitro symbiotic seed germination of *Spathoglottis plicata* Blume on common orchid cultivation substrates. *Scientia Horticulturae*, 160, 238–242. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.05.034>
- Aragón, C. E., Escalona, M., Rodriguez, R., Cañal, M. J., Capote, I., Pina, D., and González-Olmedo, J. (2010). Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 46(1), 89–94. <https://doi.org/10.1007/s11627-009-9246-2>
- Aragón, C. E., Sánchez, C., Gonzalez-Olmedo, J., Escalona, M., Carvalho, L., and Amâncio, S. (2014). Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors and gelled medium during in vitro growth and acclimatization. *Biologia Plantarum*, 58(1), 29–38. <https://doi.org/10.1007/s10535-013-0381-6>
- Baltazar Bernal, O., Zavala Ruiz, J., Solís Zanotelli, F. Y., Pérez Sato, J. A., y Sánchez Eugenio, O. (2014). Sendero interpretativo de orquídeas y bromelias en Tepexilotla, Chocamán, Veracruz. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, Pub. Esp (9), 1687-1699. Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=263137781013>
- Bello-Bello, J. J., Spinoso-Castillo, J., and Iglesias-Andreu, L. G. (2014). Establecimiento de un sistema de biorreactores para la micropropagación de Vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews). *Agroproductividad*. 63-68.

- Cabrera Jova, M., Gómez Kosky, R., and Espinosa Cuellar, E. (2011). Effect of liquid media culture systems on yam plant growth (*Dioscorea alata* L. ‘Pacala Duclos’). *BASE*. Recuperado a partir de <http://popups.ulg.ac.be/1780-4507/index.php?id=7886%3E%253B>.
- Castañeda-Zárate, M., Viccon-Esquivel, J., Ramos-Castro, S. E., and Solano-Gómez, R. (2012). Registros nuevos de Orchidaceae para Veracruz, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 83(1), 281–284.
- Debergh, P., and Zimmerman, R. H. (2012). *Micropropagation: Technology and Application*. Springer Science & Business Media.
- Ducos, J.-P., Lambot, C., and Pétiard, V. (2007). Bioreactors for Coffee Mass Propagation by Somatic Embryogenesis. *International Journal of Plant Developmental Biology*, 1, 1–12.
- Dutra, D., Johnson, T. R., Kauth, P. J., Stewart, S. L., Kane, M. E., and Richardson, L. (2008). Asymbiotic seed germination, in vitro seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 94(1), 11–21. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9382-0>
- Etienne, H., and Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 215–231. <https://doi.org/10.1023/A:1015668610465>
- Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., González, J. L., Desjardins, Y., and Borroto, C. G. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18(9), 743–748. <https://doi.org/10.1007/s002990050653>

- Ferreira, W. de M., Vasconcelos, M. C. de, Silva, C. C. N., Oliveira, H. R. de, and Suzuki, R. M. (2017). Asymbiotic germination, multiplication and development of *Alatiglossum fuscopetalum* (Orchidaceae) as affected by culture medium, sucrose and growth regulators. *Iheringia. Série Botânica.*, 72(1), 57–65.
- Fowlie, J. A. 1970. The genus *Lycaste*. Day printing corporation. Pomona, California.
- Gutierrez-Miceli, F. A., Ayora-Talavera, T., Abud-Archila, M., Salvador-Figueroa, M., Adriano-Anaya, L., Hernandez, M. L. A., and Dendooven, L. (2008). Acclimatization of Micropropagated Orchid *Guarianthe skinnerii* Inoculated with *Trichoderma harzianum*. *Asian Journal of Plant Sciences*. Recuperado a partir de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012050703>
- Hágsater, E., Soto Arenas, M.A., Salazar Chávez, G.A., Jiménez Machorro, R., López Rosas, M.A. y Dressler, R.L. (2005). Las orquídeas de México. Instituto Chinoín A.C. México. 303 p.
- Hágsater, E. Salazar G.A. (ed.). 1990 Icones Orchidacearum; fascicle 1. Orchids of Mexico: part 1. Mexico DF: Asociacion Mexicana de Orquideologia AC, 104.
- Hietz, P., Winkler, M., Cruz-Paredes, L., and Jiménez-Aguilar, A. (2006). Breeding Systems, Fruit Set, and Flowering Phenology of Epiphytic Bromeliads and Orchids in a Mexican Humid Montane Forest. *Selbyana*, 27(2), 156–164.
<https://doi.org/10.2307/41760278>
- Hossain, M. M. (2008). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Epidendrum ibaguense* Kunth. (Orchidaceae). *African Journal of Biotechnology*, 7(20). Recuperado a partir de <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/59389>

- Hossain, M. M., Sharma, M., Teixeira da Silva, J. A., and Pathak, P. (2010). Seed germination and tissue culture of *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl. *Scientia Horticulturae*, 123(4), 479–487. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.10.009>
- Kalimuthu, K., Senthilkumar, R., and Vijayakumar, S. (2007). In vitro micropropagation of orchid, *Oncidium* sp. (Dancing Dolls). *African Journal of Biotechnology*, 6(10). Recuperado a partir de <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/57136>
- Kauth, P. J., Vendrame, W. A., and Kane, M. E. (2006). In vitro seed culture and seedling development of *Calopogon tuberosus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85(1), 91–102. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-9055-1>
- Latawa, J., Shukla, M. R., and Saxena, P. K. (2015). An efficient temporary immersion system for micropropagation of hybrid hazelnut. *Botany*, 94(1), 1–8. <https://doi.org/10.1139/cjb-2015-0111>
- Macedo, M. C., Rosa, D. B. C. J., Soares, J. S., Tatara, M. B., Hoffmann, N. T. K., and Rosa, Y. B. C. J. (2014). Seed storage and acclimatization of *Brassavola tuberculata* Hook. *Semina: Ciências Agrárias*, 35(6), 2883–2894. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n6p2883>
- Manhães, N. E., Jasmim, J. M., Silva, L. A. A., Castro, B. B., Motta, N. L., Pereira, V. R., and Erthal, A. P. R. C. (2015). Loofah Fiber and Sphagnum Moss in the Acclimatization of *Cattleya guttata* and *Zygopetalum mackayi* Inoculated with Plant Growth-Promoting Bacteria. *Acta Horticulturae*, (1076), 113–118. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1076.12>
- Mata-Rosas, M., Baltazar-García, R. J., Moon, P., Hietz, P., and Luna-Monterrojo, V. E. (2010). In vitro regeneration of *Lycaste aromatica* (Graham ex Hook) Lindl. (Orchidaceae) from pseudobulb sections. *Plant Biotechnology Reports*, 4(2), 157–163. <https://doi.org/10.1007/s11816-010-0132-5>

- Mengarda, L. H. G., Cola, G. P. A., Oliveira, S. C. de, and Freitas, A. R. de. (2017). Multiplication, rooting in vitro, and acclimatization of *Brassavola tuberculata* Hook. (Orchidaceae), an orchid endemic to the brazilian atlantic rainforest = Multiplicação, enraizamento in vitro e aclimatização de *Brassavola tuberculata* Hook (Orchidaceae), uma orquídea endêmica da mata atlântica brasileira. *Bioscience Journal*, 33(3). <https://doi.org/10.14393/BJ-v33n3-32987>
- Moreira, A. L., Silva, A. B. da, Santos, A., Reis, C. O. dos, and Landgraf, P. R. C. (2013). *Cattleya walkeriana* growth in different micropropagation systems. *Ciência Rural*, 43(10), 1804–1810. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782013001000012>
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Pridgeon A. (1992). The illustrated encyclopedia of orchids. First edition. Timber Press. Sydney, NSW. 304 p.
- Quiroz, K., Saavedra, J., Vogel, H., Verdugo, G., Caligari, P. D. S., and García-González, R. (2017). In Vitro Asymbiotic Germination for Micropropagation of the Recalcitrant Terrestrial Orchid *Chloraea crispa* (Orchidaceae). *Applications in Plant Sciences*, 5(8), 1600142. <https://doi.org/10.3732/apps.1600142>
- Rabaiolli, S. M. dos S., Reiniger, L. R. S., Stefanel, C. M., Silva, K. B. da, Paim, A. F., Ziegler, A. C. da F., ... Ziegler, A. C. da F. (2017). Agar does not affect in vitro rhizogenesis and ex vitro acclimatization of *Handroanthus chrysotrichus*. *CERNE*, 23(2), 185–192. <https://doi.org/10.1590/01047760201723022289>

- Ramírez-Mosqueda, M. A., and Iglesias-Andreu, L. G. (2016). Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 52(2), 154–160. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9735-4>
- Ramos-Castellá, A., Iglesias-Andreu, L. G., Bello-Bello, J., and Lee-Espinosa, H. (2014). Improved propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 50(5), 576–581. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9602-8>
- Rasmussen, H. N., and Whigham, D. F. (1993). Seed Ecology of Dust Seeds in Situ: A New Study Technique and Its Application in Terrestrial Orchids. *American Journal of Botany*, 80(12), 1374–1378. <https://doi.org/10.2307/2445665>
- Rodrigues, L. A., Neto, P., De, V. B., Boaretto, A. G., Oliveira, J. F. de, Torrezan, M. de A., ... Otoni, W. C. (2015). In vitro propagation of *Cyrtopodium saintlegerianum* rchb. f. (orchidaceae), a native orchid of the Brazilian savannah. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 15(1), 10–17. <https://doi.org/10.1590/1984-70332015v15n1a2>
- Scagel, C. F. (2003). Growth and Nutrient Use of Ericaceous Plants Grown in Media Amended with Sphagnum Moss Peat or Coir Dust. *HortScience*, 38(1), 46–54.
- Scheffknecht, S., Winkler, M., Hülber, K., Rosas, M. M., and Hietz, P. (2010). Seedling establishment of epiphytic orchids in forests and coffee plantations in Central Veracruz, Mexico. *Journal of Tropical Ecology*, 26(1), 93–102. <https://doi.org/10.1017/S0266467409990332>

- Silva, A. B. da, Reis, C. O. dos, Cazetta, J. O., Carlin, S. D., Landgraf, P. R. C., and Reis, M. C. dos. (2016). Effects of exogenous proline and a natural ventilation system on the in vitro growth of orchids. *Bioscience Journal*, 32(3).
<https://doi.org/10.14393/BJ-v32n3a2016-31368>
- Soto Arenas, M. A., Solano Gómez, R., and Hágstater, E. (2007). Risk of extinction and patterns of diversity loss in Mexican orchids. *Lankesteriana International Journal on Orchidology*, 7(1–2). Recuperado a partir de
<http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=44339813020>
- Srivastava, D., Gayatri, M. C., and Sarangi, S. K. (2015). In vitro seed germination and plant regeneration of an epiphytic orchid *Aerides ringens* (Lindl.) Fischer. *IJBT Vol.14(4) [October 2015]*, 14(4). Recuperado a partir de
<http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/34010>
- Stewart, S. L., and Kane, M. E. (2006). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(2), 147–158.
<https://doi.org/10.1007/s11240-006-9098-y>
- Tejeda, S. O., Téllez, V. M. A., and Guzmán, H. E. J. (2013). Las orquídeas de Tepexilota, Chocamán, Agroproductividad. 6 (3): 21-27.
- Venturieri, G. A., and Arbieto, E. A. M. de. (2011). Ex-vitro establishment of *Phalaenopsis amabilis* seedlings in different substrates. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 33(3), 495–501. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v33i3.3950>

- Wang, H., Fang, H., Wang, Y., Duan, L., and Guo, S. (2011). In situ seed baiting techniques in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo and *Dendrobium nobile* Lindl. : the endangered Chinese endemic *Dendrobium* (Orchidaceae). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(9), 2051–2059.
<https://doi.org/10.1007/s11274-011-0667-9>
- Winkler, M., and Hietz, P. (2001). Population Structure of Three Epiphytic Orchids (*Lycaste aromatica*, *Jacquinella leucomelana*, and *J. teretifolia*) in a Mexican Humid Montane Forest. *Selbyana*, 22(1), 27–33. <https://doi.org/10.2307/41760079>
- Winkler, M., Hülber, K., and Hietz, P. (2009). Population dynamics of epiphytic orchids in a metapopulation context. *Annals of Botany*, 104(5), 995–1004.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcp188>
- Winkler, M., Hülber, K., Mehlreter, K., Franco, J. G., and Hietz, P. (2005). Herbivory in epiphytic bromeliads, orchids and ferns in a Mexican montane forest. *Journal of Tropical Ecology*, 21(2), 147–154. <https://doi.org/10.1017/S0266467404002081>

CAPITULO 1. Germinación *in vitro* y desarrollo de *Lycaste aromatica* (Graham) Lindl. en biorreactor de inmersión por gravedad

Resumen

Se desarrollaron procedimientos para la germinación asimbiótica de semillas y el desarrollo de plántulas de *Lycaste aromatica* (Graham) Lindl., en un sistema de biorreactores de inmersión por gravedad (BIG). Esta orquídea es de gran importancia por la escases en su hábitat natural y su aroma a canela. Se examinaron cuatro medios de cultivo para la germinación *in vitro*: $\frac{1}{2}$ Murashige y Skoog (MS), MS, $\frac{1}{2}$ Knudson C, Knudson C y se comparó la eficiencia del protocolo de cultivo *in vitro* empleando el medio semisólido y con cuatro frecuencias de inmersión del sistema BIG en medio líquido utilizando 30 ml de medio MS por plántula. La germinación inició a las 8 semanas y se prolongó durante 6 semanas más y el mejor tratamiento fue $\frac{1}{2}$ MS con 27 semillas germinadas. El cultivo en biorreactores permitió alcanzar en 90 días de cultivo diferencias significativas en las variables de número de hojas (10 hojas), numero de raíz (4.7 raíces) y altura de plántula (5.4 cm). Sin embargo, las plántulas desarrolladas en el medio semisólido obtuvieron un mayor número de brotes (1.6 brotes) y longitud de raíz (2 cm), además el medio de cultivo líquido mostró la mayor tasa de fotosíntesis ($0.740 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). El sistema de cultivo en biorreactores es una excelente alternativa para el desarrollo de esta especie debido a que ayudan a incitar la fotosíntesis y aumentan el tamaño de la plántula, lo que podría favorecerlas en su aclimatización.

Palabras clave: germinación asimbiótica, BIG, semisólido, plántula

CHAPTER 1. In vitro germination and development of *Lycaste aromatica* (Graham)

Lindl. in gravity immersion bioreactor

Abstract

Procedures were developed for the asymbiotic germination of seeds and the development of *Lycaste aromatica* plantlets in a gravity immersion bioreactor system (BIG). This orchid is of great importance due to the scarcity of its natural habitat and its cinnamon fragrance. Four culture media for in vitro germination were examined: ½ Murashige and Skoog (MS), MS, ½ Knudson C, Knudson C and the efficiency of the *in vitro* culture protocol was compared using the semi-solid medium and four immersion frequencies of the BIG system in liquid medium using 30 ml of MS medium per plantlets. Germination started at 8 weeks and lasted for 6 more weeks and the best treatment was ½ MS with 27 germinated seeds. The cultivation in bioreactors allowed reaching in 90 days of cultivation significant differences in the variables of number of leaves (10 leaves), root number (4.7 roots) and height of plantlets (5.4 cm). However, the plantlets developed in the semi-solid medium obtained a greater number of shoots (1.6 shoots) and root length (2 cm), in addition the liquid culture medium showed the highest rate of photosynthesis ($0.740 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). The cultivation system in bioreactors is an excellent alternative for the development of this species because they help to incite photosynthesis and increase the size of the seedling, which could favor them in its acclimatization.

Keywords: asymbiotic germination, BIG, semisolid, plantlet

1.1 Introducción

Lycaste aromatica (Graham) Lind es una orquídea silvestre muy atractiva en el mercado de las ornamentales por su aroma agradable a canela y, por esto, su población está amenazada debido a la sustracción ilegal de su hábitat. Las plantas en floración son extraídas del bosque mesófilo de montaña (BMM) de Chocamán lo que ocasiona la escases de individuos en el BMM donde se encuentra un solo ejemplar en 4 km de recorrido (Baltazar Bernal *et al.*, 2014).

Las semillas de orquídeas son la mejor fuente para conservar su diversidad genética, sin embargo, raramente se recolectan, siembran o almacenan. A pesar de varios intentos de preservar la población de orquídeas en la naturaleza, aún disminuyen a un ritmo alarmante (Diengdoh *et al.*, 2017). Existen varios estudios de métodos de conservación *in situ* para ayudar a preservar las orquídeas, sin embargo el porcentaje de germinación es muy bajo (Aewsakul *et al.*, 2013; Diengdoh *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2011; Zettler *et al.*, 2011). Por otro lado la germinación *in vitro* en el medio de cultivo Murashige y Skoog (Murashige and Skoog, 1962) varía del 50 al 75% (Hossain, 2008; Hossain *et al.*, 2010).

La germinación asimbiótica de semillas de orquídeas se ha utilizado para la producción de orquídeas con potencial ornamental como *Aerides ringens* (Lindl.) (Srivastava *et al.*, 2015), *Calopogon tuberosus* var. *tuberosus* (Kauth *et al.*, 2006) y *Epidendrum ibaguense* Kunth (Hossain, 2008) y ha demostrado ser una herramienta eficiente para la producción de orquídeas con fines de conservación y reintroducción (Dutra *et al.*, 2008; Stewart and Kane, 2006).

El interés en el uso de biorreactores de inmersión temporal, ha aumentado durante la última década (Aragón *et al.*, 2014) y garantizan un mejor desarrollo de las plántulas (Aragón *et al.*, 2014; Cabrera *et al.*, 2011; Latawa *et al.*, 2015; Ramírez-Mosqueda and Iglesias-Andreu,

2016; Ramos-Castellá *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2016) en comparación con el medio semisólido. Sin embargo, los sistemas convencionales de micropropagación que utilizan medio semisólido son todavía ampliamente utilizados para el desarrollo de plántulas de orquídeas (Dutra *et al.*, 2008; Kalimuthu *et al.*, 2007; Quiroz *et al.*, 2017; Rabaiolli *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2015; Srivastava *et al.*, 2015). El Sistema de Inmersión Temporal (SIT) es el cultivo de células, tejidos u órganos expuestos temporalmente a medio de cultivo líquido en biorreactores semiautomatizados bajo condiciones axénicas y controladas (Bello-Bello *et al.* 2014). El comportamiento de los estomas y la tasa neta de fotosíntesis de las plántulas de orquídeas producidas en biorreactor de inmersión por gravedad (BIG) son importantes en el desarrollo y aclimatación de las plántulas, pero aún no se ha estudiado.

El propósito de este trabajo fue evaluar los medios de cultivo para la germinación *in vitro* y el desarrollo de plántulas *L. aromatica* (Graham) Lindl. en cuatro frecuencias de inmersión en BIG y medio semisólido.

1.2 Materiales y métodos

1.2.1 Material vegetal

La cápsula de *Lycaste aromatica* (Graham) Lindl. se colectó en la comunidad de Tepexilotla, municipio de Chocamán, Veracruz y se almacenó a 5°C por 7 días para su siembra en diferentes medios. Para el desarrollo en biorreactor se utilizaron plántulas de 2.5 cm de longitud con 36 semanas posteriores a la germinación de las primeras semillas.

1.2.2 Medios de cultivo

Las semillas fueron sembradas en medios de cultivo de Murashige y Skoog MS (Murashige and Skoog, 1962) y Knudson C KC (Knudson, 1946) (Cuadro 1) para evaluar el efecto de la concentración de sales minerales y sacarosa en la germinación. Todos los medios contenían

2.5 g L⁻¹ de phytigel (Sigma®) y el pH fue ajustado a 5.7 ± 0.1 antes de agregar el phytigel y después fue esterilizado a 120 °C durante 15 minutos.

Cuadro 1. Medios de cultivo utilizados para la germinación de semillas de *Lycaste aromatica* (Graham) Lindl

| Tratamientos | Sacarosa g L ⁻¹ |
|----------------------------|----------------------------|
| T ₁ ½ MS | 15 |
| T ₂ MS | 30 |
| T ₃ ½ Knudson C | 15 |
| T ₄ Knudson C | 30 |

Para evaluar el desarrollo de las plántulas de *L. aromatica* (Graham) Lindl se utilizó el medio MS líquido para los Biorreactores de Inmersión por Gravedad (BIG) y el medio semisólido MS para el método tradicional con un pH ajustado a 5.7 ± 0.1 y luego fue esterilizado a 120 °C durante 15 minutos.

1.2.3 Germinación *in vitro*

La cápsula madura de *L. aromatica* (Graham) Lindl. se desinfectó conforme a lo siguiente: se le eliminó los restos de la flor y el pedúnculo; se lavaron con detergente Axion® limón y agua purificada; la cápsula se sumergió en una solución de agua purificada con cloro comercial al 20% más 1 gota de detergente Axion® limón, por 20 min con agitaciones constantes; se retiró la solución y se enjuago; después fue sumergido en 1 g L⁻¹ de Ridomil Bravo ®81 por 5 min y enjuagado 4 veces con agua destilada estéril dando un minuto por cada enjuague en la campana de flujo laminar; se asperjó con alcohol y se flameó por 3 segundos. Posteriormente la cápsula se seccionó transversalmente en los extremos y longitudinalmente con el bisturí y las pinzas previamente esterilizados, se colocó una porción de semillas sobre los diferentes medios de cultivo contenidos en frascos de 200 ml con 20 ml

de medio de cultivo, se cubrieron con tapas de plástico transparente y se sellaron con Kleen pack ®. Posteriormente se llevaron a un cuarto de incubación a 22°C, un fotoperiodo de 16 h luz con intensidad lumínica de 72 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ producida por lámparas de luz blanca fría fluorescente y 8 h de oscuridad.

1.2.4 Desarrollo de plántulas

En la fase de desarrollo se utilizaron 4 tratamientos en biorreactor de inmersión por gravedad (BIG) según lo descrito por Georgiev *et al.*, (2014), que consiste en un sistema de dos frascos conectados con una manguera de silicona, donde un frasco sirve para la reserva del medio de cultivo y el otro para almacenar las plántulas y un tratamiento en medio semisólido (Cuadro 2). El sistema se ajustó a un periodo de inmersión de 3 minutos en cada frecuencia de tiempo durante 14 semanas. Los recipientes de cultivo fueron de 1 000 ml, conteniendo 450 ml de medio de cultivo y 15 plántulas cada uno y se incubaron a 24 ± 1 °C con un fotoperiodo de 16 h luz proporcionando 57 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 8 h oscuridad.

Cuadro 2. Tratamientos para el desarrollo de plántulas de *Lycaste aromatica* (Graham)

Lindl

| | Frecuencia (horas) | Medio de cultivo |
|----------------|--------------------|------------------|
| T ₁ | 4 | Líquido |
| T ₂ | 6 | Líquido |
| T ₃ | 8 | Líquido |
| T ₄ | 12 | Líquido |
| T ₅ | 0 | Semisólido |

1.2.5 Variables evaluadas y análisis estadístico

La variable evaluada para la germinación fue el número de semillas germinadas de 1 mm por frasco y se cuantifico semanalmente por 6 semanas, posterior a la aparición de la primera

semilla germinada. Para esta variable se empleó un diseño experimental completamente al azar con medidas repetidas y tres repeticiones. Los datos se analizaron mediante una estructura de modelo de covarianza ANTE [1] y comparación de medias con la prueba de Tukey mediante el programa SAS versión 9.4 (SAS, 2012).

En el desarrollo de las plántulas se midió la supervivencia, el número de hojas, la altura de la plántula, el número y el diámetro de brote, el número y la longitud de raíces, el peso fresco y el peso seco.

También se midió el índice estomático, largo y ancho del estoma por campo de 40x en un microscopio óptico Nikon Axio Zeiss equipado con cámara fotográfica digital AxioCam 1Cc3, en 15 hojas por tratamiento; se eliminó el medio de cultivo de las hojas maduras y en la parte central a los 15 minutos se les aplicó esmalte de uñas transparente en la parte adaxial y abaxial (Li, *et al.*, 2010). Cuando el esmalte de uñas se había secado al aire y formado una membrana, se desprendió y se fijó sobre un porta objetos con una gota de agua para permitir el análisis de la muestra (Silva *et al.*, 2000).

El intercambio de CO₂ en luz e intercambio de CO₂ en oscuridad ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) se registraron usando un Analizador de Gases Infrarrojo (IRGA) portátil modelo LI-6200 (Licor, Inc, Nebraska, USA). La fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) se calculó de la diferencia entre el intercambio de CO₂ en oscuridad e intercambio de CO₂ en luz. Después de medir el intercambio de CO₂ en luz, se taparon las plántulas durante 5 minutos y se midió el intercambio de CO₂ en oscuridad. Las mediciones se realizaron entre 11:00 y las 13:00 h en una planta seleccionada al azar para cada tratamiento y se realizaron tres mediciones consecutivas en luz y tres en oscuridad. Las mediciones se obtuvieron a una temperatura de hoja de 30 ± 1 °C. Para estas variables se empleó un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones. Los resultados se analizaron mediante un modelo de varianza y

comparación de medias con la prueba de Tukey mediante el programa SAS versión 9.4 (SAS, 2012).

Para extraer y determinar el contenido de clorofila a, b y total presente en las hojas a las 6 semanas se procedió de la siguiente manera. Utilizando una balanza granataria ADAM® se pesaron 0.25 g de hojas y estas se picaron finamente utilizando un bisturí; posteriormente ese material se colocó en frascos de vidrio cubiertos con papel aluminio y se le añadió 2.5 ml de acetona al 80% y los frascos se almacenaron en oscuridad a 4 °C durante 24 horas. Después la muestra se molió totalmente en un mortero, se filtró y se aforó a 6.25 ml con acetona al 80%; de esta solución se tomó una muestra de 2 mL y se colocó en una celda para leer su absorbancia a 645 y 663 nm en el espectrofotómetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific) utilizando acetona al 80% como blanco (Harborne, 1973).

La cantidad de clorofila se obtuvo por medio de las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clorofila } a = \frac{(12.7(A_{663}) - 2.59(A_{645})) * V}{1000 * P}$$

$$\text{Clorofila } b = \frac{(22.9 (A_{645}) - 4.70(A_{663})) * V}{1000 * P}$$

$$\text{Clorofila } total = \frac{(8.20(A_{663}) - 20.2 (A_{645})) * V}{1000 * P}$$

Donde A663 es la absorbancia en la longitud de onda de 663 nm, A645 es la absorbancia en la longitud de onda de 645 nm, V es el volumen aforado (ml) y P es el peso de la muestra (g).

Para el número de hojas, la altura de la plántula, el número y el diámetro de brote, el número y la longitud de raíces, el peso fresco y seco, el largo y ancho del estoma, la apertura del estoma, el número de estomas por campo, fotosíntesis, respiración en luz y oscuridad y contenido de clorofila a, b y total se empleó un diseño experimental completamente al azar

con tres repeticiones. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de LSD de Fisher mediante el programa SAS versión 9.4.

1.3 Resultados

1.3.1 Germinación *in vitro*

Las semillas germinaron a las 8 semanas posteriores a la siembra, cuando se observó un hinchamiento en el embrión y se formaron protocormos de un 1 mm de longitud. Como respuesta al modelo de covarianza se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (P=0.0001) y en la interacción entre tratamiento y tiempo (P=0.0136). El tratamiento 1 obtuvo 27 semillas que fue el mayor número de semillas germinadas en comparación con los otros tratamientos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto del medio de cultivo sobre la germinación *in vitro* de *Lycaste aromatica* en promedio de 6 semanas

| Tratamientos | Número de semillas |
|---------------------------|--------------------|
| 1 $\frac{1}{2}$ MS | 27.1111 ± 2.1765a |
| 2 MS | 11.0000 ± 2.1765bc |
| 3 $\frac{1}{2}$ Knudson C | 5.5556 ± 2.1765c |
| 4 Knudson C | 14.1667 ± 2.1765b |

Los valores representan la media ± ES (error estándar). Medias con diferente letra entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, p ≤ 0.05).

Se puede constatar que el número de semillas germinadas alcanzó su máximo valor en las primeras dos semanas para el caso del tratamiento 1; por otro lado, para el tratamiento 4 la máxima germinación se dio entre la quinta y sexta semana. Los tratamientos 3 y 4 presentaron una germinación retardada y menor. El mejor tratamiento con respecto a la germinación de

Lycaste aromatica (Graham) Lind. resultó de la reducción al 50% del medio de cultivo Murashige y Skoog y la sacarosa (Figura 4).

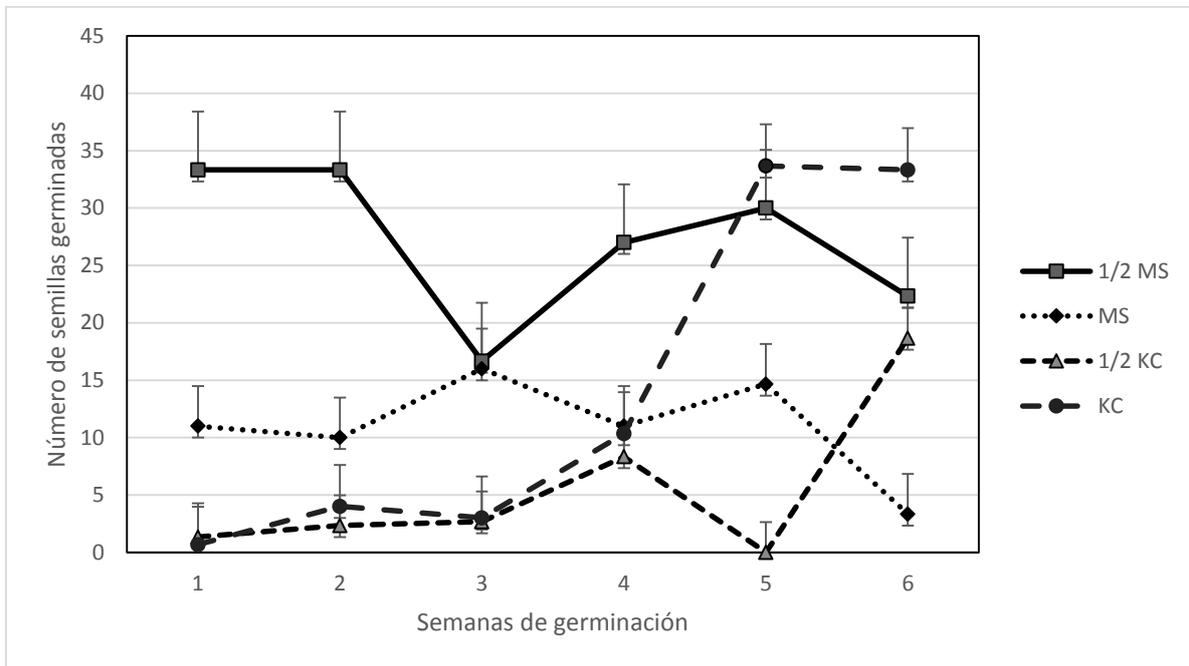


Figura 4. Comportamiento del número de semillas germinadas de *Lycaste aromatica* desarrolladas en cuatro diferentes medios de cultivo durante seis semanas

1.3.2 Desarrollo de plántulas *in vitro*

1.3.2.1 Variables morfológicas

El análisis de las variables estudiadas mostró algunos efectos significativos de los diferentes sistemas de micropropagación (Figura 5). La supervivencia, el número de hojas, número de brotes, número de raíz, altura de plántula y la longitud de raíz fueron afectados significativamente por los tratamientos. El sistema BIG con 8 h de inmersión obtuvo el 100% de supervivencia y BIG con 12 h de inmersión obtuvo el porcentaje más bajo (62.2%). Se desarrollaron un mayor número de hojas en el sistema BIG con 6 horas de inmersión (10.60), seguido del medio semisólido (8.71). El mayor número de brotes se observó en el medio semisólido con 1.6 brotes, seguido de BIG con 6 h de inmersión con 1.3 brotes. En BIG con 12 h de inmersión se obtuvieron 4.7 raíces, que fue el mejor tratamiento para esta variable.

Con respecto a la altura de plántula, el mayor resultado se demostró en BIG con 12 h de inmersión (5.4 cm) y el menor en BIG con 6 h de inmersión (3.8 cm). Para la variable longitud de raíz, el mejor resultado se obtuvo en el medio semisólido (2.08). En el diámetro, peso fresco y peso seco no se observaron diferencias significativas (Cuadro 4).



Figura 5. Morfología de las plántulas de *L. aromatica* (Graham) Lindl. en los tratamientos. a) BIG 4 h de inmersión, b) BIG 6 h de inmersión, c) BIG 8 h de inmersión, d) BIG 12 h de inmersión y e) medio semisólido. Barra: 2.5 cm.

Cuadro 4. Efecto del sistema de cultivo y la frecuencia de inmersión sobre el desarrollo *in vitro* de *Lycaste aromatica*

| Sistema de cultivo | Inmersión (horas) | Supervivencia (%) | No. Hojas | No. Brotes | No. Raíz | Altura de plántula (cm) | Diámetro (cm) | Longitud de raíz (cm) | Peso fresco (g) | Peso seco (g) |
|--------------------|-------------------|-------------------|-----------|------------|----------|-------------------------|---------------|-----------------------|-----------------|---------------|
| BIG | 4 | 80.00ab | 8.47b | 1.21b | 3.57b | 4.26ab | 0.60a | 0.92b | 0.403a | 0.021a |
| BIG | 6 | 97.77a | 10.60a | 1.30ab | 3.78b | 3.82b | 0.70a | 1.02b | 0.493a | 0.022a |
| BIG | 8 | 100.00a | 8.41b | 1.18b | 4.28ab | 5.09ab | 0.65a | 1.04b | 0.483a | 0.037a |
| BIG | 12 | 62.22b | 8.16b | 1.07b | 4.72a | 5.47a | 0.61a | 1.23b | 0.410a | 0.026a |
| Medio semisólido | 24 | 77.77ab | 8.71ab | 1.60a | 4.31ab | 4.10ab | 0.71a | 2.08a | 0.193a | 0.013a |

Los valores representan la media. Medias con diferente letra entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Biorreactor de Inmersión por Gravedad (BIG).

1.3.2.2 Estomas

El índice estomático y el largo del estoma en el envés de la lámina foliar no fueron estadísticamente diferentes entre los tratamientos (Cuadro 5). El ancho del estoma mostro diferencias significativas entre los tratamientos y el medio semisólido presentó el mayor ancho de estoma con 245.79 μm , seguido del sistema BIG con 6 y 12 h de inmersión, con 209.72 μm y 204.76 μm respectivamente.

Cuadro 5. Índice y caracterización estomática del envés de la hoja de *L. aromatica* (Graham) Lindl.

| Sistema de cultivo | Inmersión (horas) | Índice estomático (mm^2) | Largo de estoma (μm) | Ancho de estoma (μm) |
|--------------------|-------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| BIG | 6 | 9.29 \pm 0.40a | 249.67 \pm 15.90a | 209.72 \pm 8.23b |
| BIG | 12 | 8.43 \pm 0.40a | 231.28 \pm 15.90a | 204.76 \pm 8.23b |
| Medio semisólido | 24 | 8.28 \pm 0.40a | 264.95 \pm 15.90a | 245.79 \pm 8.23a |

Los valores representan la media \pm ES (error estándar). Medias con diferente letra entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Biorreactor de Inmersión por Gravedad (BIG).

El índice estomático, largo de estoma y ancho de estoma del haz de la lámina foliar mostró diferencias significativas entre los tratamientos favoreciendo al medio semisólido (Cuadro 6).

Cuadro 6. Índice y caracterización estomática del haz de la hoja de *L. aromatica* (Graham) Lindl.

| Sistema de cultivo | Inmersión (horas) | Índice estomático (mm^2) | Largo de estoma (μm) | Ancho de estoma (μm) |
|--------------------|-------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| BIG | 6 | 0.58 \pm 0.18b | 81.07 \pm 23.24b | 68.27 \pm 21.65b |
| BIG | 12 | 0.29 \pm 0.18b | 60.27 \pm 23.24b | 48.80 \pm 21.65b |
| Medio semisólido | 24 | 1.32 \pm 0.18a | 177.44 \pm 23.24a | 165.56 \pm 21.65a |

Los valores representan la media \pm ES (error estándar). Medias con diferente letra entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Biorreactor de Inmersión por Gravedad (BIG).

En el envés y en el haz de la hoja de *L. aromatica* (Graham) Lindl. se observó la presencia de estomas, sin embargo el índice estomático en el envés fue ocho veces mayor que en el haz (Figura 6).

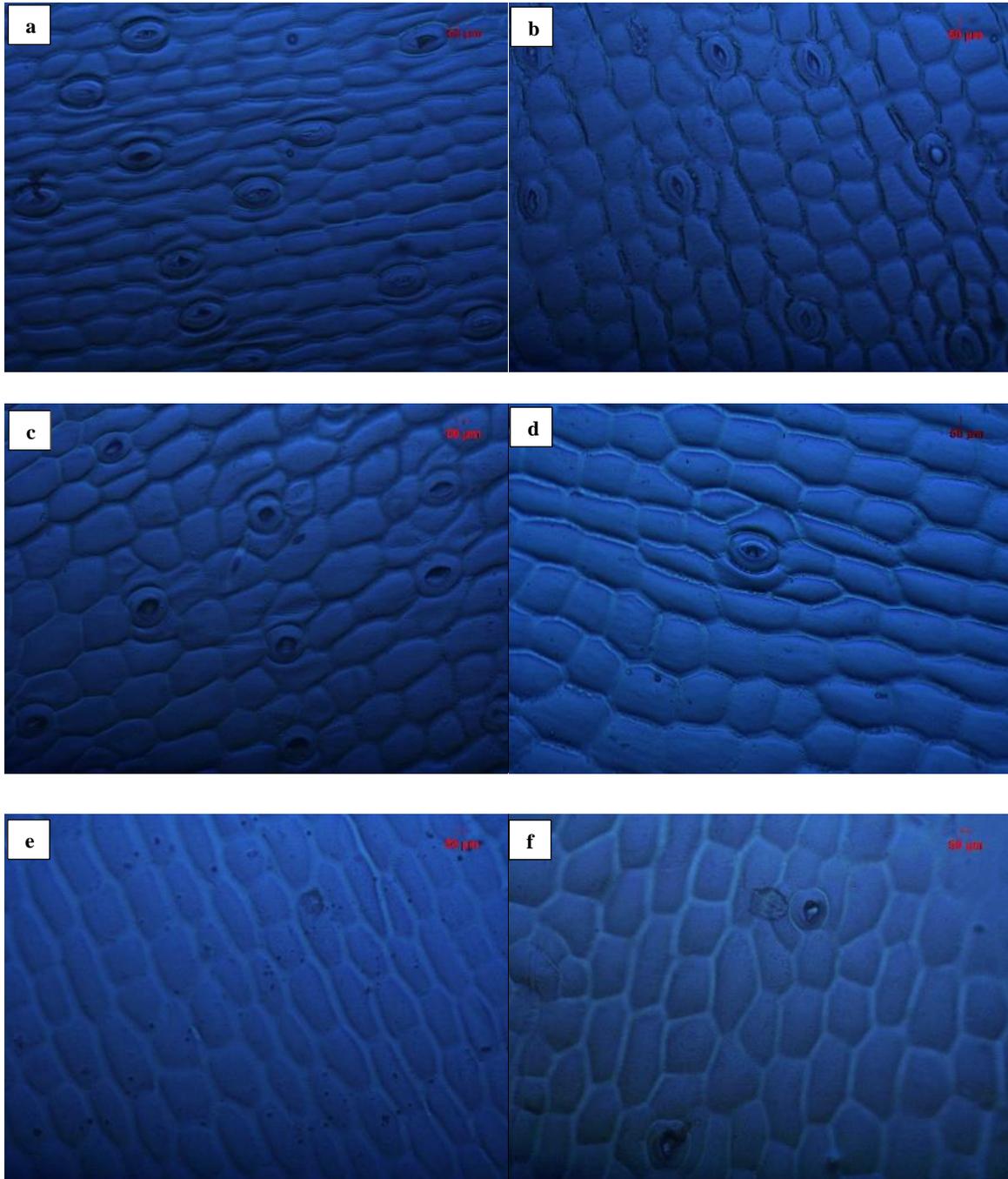


Figura 6. Estomas de la hoja de *L. aromatica* (Graham) Lindl.

Parte abaxial: a: BIG 6 h de inmersión, b: BIG 12 h de inmersión, c: medio semisólido. Parte adaxial d: BIG 6 h de inmersión, e: BIG 12 h de inmersión y f: medio semisólido

1.3.2.3 Respiración

La tasa fotosintética fue más alta en BIG con 12 horas de inmersión ($0.74 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), por el contrario, en las plántulas cultivadas en medio semisólido la tasa fotosintética disminuyó ($0.265 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). En el intercambio de CO_2 en luz y en oscuridad, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Efecto del sistema de micropropagación sobre el intercambio de CO_2 y la fotosíntesis en plantas de *Lycaste aromatica* (Graham) Lind.

| Sistema de cultivo | Inmersión (horas) | Intercambio de CO_2 ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | | Fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)* |
|--------------------|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|----------------------------------------------------------------------|
| | | Luz | Oscuridad | |
| BIG | 4 | $0.958 \pm 0.187a$ | $1.347 \pm 0.127a$ | $0.530 \pm 0.089ab$ |
| BIG | 6 | $0.852 \pm 0.187a$ | $1.277 \pm 0.127a$ | $0.307 \pm 0.089b$ |
| BIG | 8 | $0.953 \pm 0.187a$ | $1.498 \pm 0.127a$ | $0.589 \pm 0.089ab$ |
| BIG | 12 | $0.611 \pm 0.187a$ | $1.256 \pm 0.127a$ | $0.740 \pm 0.089a$ |
| Medio semisólido | 24 | $0.881 \pm 0.187a$ | $1.286 \pm 0.127a$ | $0.265 \pm 0.089b$ |

Los valores representan la media \pm ES (error estándar). Medias con diferente letra entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Biorreactor de Inmersión por Gravedad (BIG). *Calculada de la diferencia entre el intercambio gaseoso en oscuridad y luz.

Al evaluar el medio de cultivo, la fotosíntesis aumento al doble en el medio líquido ($0.5419 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en comparación con el semisólido, sin observar diferencias significativas en el intercambio de CO_2 en luz y oscuridad (Cuadro 8).

Cuadro 8. Efecto del medio de cultivo sobre la fotosíntesis e intercambio de CO₂ en plantas de *Lycaste aromatica* (Graham) Lind.

| Medio de cultivo | Intercambio de CO ₂ (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹) | | Fotosíntesis (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)* |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------|
| | Luz | Oscuridad | |
| Líquido | 0.844 ± 0.091a | 1.344 ± 0.077a | 0.541 ± 0.055a |
| Semisólido | 0.881 ± 0.183a | 1.286 ± 0.090a | 0.265 ± 0.110b |

Los valores representan la media ± ES (error estándar). Medias con diferente letra entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, p ≤ 0.05). Biorreactor de Inmersión por Gravedad (BIG). *Calculada de la diferencia entre el intercambio gaseoso en oscuridad y luz.

1.3.2.4 Clorofila

El contenido de clorofila total varía de 0.183 a 0.208 mg g⁻¹ PF y los contenidos de clorofila a, b y total no tuvieron un efecto significativo entre las horas de inmersión de BIG y el medio semisólido. Sin embargo el sistema BIG con 6 horas de inmersión obtuvo el mayor contenido de clorofila total (Cuadro 9).

Cuadro 9. Concentración de clorofila en plántulas de *Lycaste aromatica* (Graham) Lind después de 16 semanas de desarrollo *in vitro*

| Sistema de cultivo | Inmersión (horas) | Concentración de clorofila (mg g ⁻¹ PF) | | |
|--------------------|-------------------|----------------------------------------------------|----------|--------------|
| | | <i>a</i> | <i>b</i> | <i>total</i> |
| BIG | 6 | 0.140a | 0.065a | 0.208a |
| BIG | 12 | 0.123a | 0.058a | 0.183a |
| Medio semisólido | 24 | 0.121a | 0.062a | 0.185a |

Los valores representan la media. Medias con diferente letra entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, p ≤ 0.05). Biorreactor de Inmersión por Gravedad (BIG).

1.4 Discusión

1.4.1 Germinación *in vitro*

Las semillas de *L. aromatica* (Graham) Lindl. iniciaron la germinación a las 8 semanas al igual que *Cymbidium giganteum* (Hossain *et al.*, 2010) y *Paphiopedilum insigne* (Diengdoh *et al.*, 2017).

El porcentaje de germinación en el tratamiento $\frac{1}{2}$ MS fue del 76% y en el $\frac{1}{2}$ KC solo fue del 1%, esto puede deberse a que el medio KC contiene una cantidad comparativamente baja de macro y micronutrientes y carece de vitaminas en comparación con el medio MS (Srivastava *et al.*, 2015). En un estudio con *Alatiglossum fuscopetalum* utilizando medio de cultivo $\frac{1}{2}$ MS se obtuvo un porcentaje del 85% de germinación (Ferreira *et al.*, 2017), sin embargo, en *Cypripedium lentiginosum* fue del 52.8% (Jiang *et al.*, 2017) y en *Paphiopedilum insigne* del 41.5% (Diengdoh *et al.*, 2017) estos dos últimos datos de germinación están por debajo de los resultados de este estudio. No hay trabajos que reporten resultados de la germinación de *L. aromatica* (Graham) Lindl. (Mata-Rosas *et al.*, 2010; Scheffknecht *et al.*, 2010). Sin embargo en *L. skinneri* en el medio KC modificado reportan una germinación del 100% aproximadamente (Mata-Rosas and Salazar-Rojas, 2009).

La germinación de orquídeas es reportada en un solo momento, los datos de germinación en este estudio sugieren que esta orquídea inicia su germinación a las 8 semanas posteriores a la siembra y se prolonga durante 6 semanas.

1.4.2 Desarrollo de plántulas *in vitro*

Existen varios estudios de orquídeas para la micropropagación en un sistema de biorreactor (Kalimuthu *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2010; Yoon *et al.*, 2007), sin embargo sólo se analiza la multiplicación de protocormos.

En el número de hojas no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de BIG y el medio semisólido, resultados similares a este estudio fueron encontrados por Moreira *et al.* (2013) que informaron que no hay diferencia significativa en el número de hojas de *Cattleya walkeriana* entre el biorreactor de inmersión temporal y la inmersión continua. También entre la micropropagación convencional y la ventilación natural (Silva *et al.*, 2016). Sin embargo en *V. planifolia* el mayor número de hojas se obtuvo en BIT® y RITA® comparado con BIG (Ramírez-Mosqueda and Iglesias-Andreu, 2016) y en este estudio se observaron 10 hojas en BIG con 6 horas de inmersión y 8 en el medio semisólido. No se encontraron diferencias significativas en el número de raíz de *Cattleya walkeriana* entre la micropropagación convencional y la ventilación natural (Silva *et al.*, 2016). Ramos-Castellá *et al.* (2014) reportan en *Vanilla planifolia* y Aragón *et al.*, (2014) reportan en *Musa AAB cv. Cemsa* $\frac{3}{4}$ una mayor altura del brote en sistema de inmersión temporal que en el medio sólido, al igual que los resultados de este estudio, por lo que posiblemente esta mayor altura de la planta se deba a que en BIG el medio de cultivo tiene contacto con todas las partes de la plántula. También en BIG se obtuvo la mayor altura del brote en *V. planifolia* (Ramírez-Mosqueda and Iglesias-Andreu, 2016). El diámetro del brote de *L. aromatica* (Graham) Lindl. fue similar a un estudio de *Vanilla planifolia* (Ramos-Castellá *et al.*, 2014). La longitud de raíz fue favorecida por el medio semisólido y estos resultados son consistentes con lo reportado por Silva *et al.* (2016) donde obtuvieron 2.4 cm de longitud de raíz en la micropropagación convencional comparado con 1.6 cm en el sistema de ventilación natural en plántulas de *Cattleya walkeriana*. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos en *Cattleya walkeriana*, que no encontraron diferencias significativas en el peso fresco entre el biorreactor de inmersión temporal y la inmersión continua (Moreira *et al.*, 2013), ni en el peso fresco y peso seco entre la micropropagación convencional y la ventilación natural de *Cattleya walkeriana* (Silva *et al.*, 2016).

Las hojas de *L. aromatica* (Graham) Lindl. mostraron estomas en la parte abaxial y adaxial de la hoja, por lo que esta especie se clasifica en anfestomática (Reyes-López *et al.*, 2015). En el envés de la hoja, el ancho de estoma fue favorecido por el medio semisólido, por lo que se puede atribuir a que en este sistema los estomas se encuentran completamente abiertos y en el BIG los estomas inician a ser funcionales. Monja-Mio *et al.* (2015) reporta que el biorreactor BioMINT permitió un mejor desarrollo de las células estomáticas y mayor deposición de células epicuticulares en hojas de *Agave angustifolia* Haw. ‘Bacanora’ en comparación con el medio semisólido, debido a la alta humedad dentro de los contenedores de medio semisólido. El funcionamiento de los estomas y la mejor regulación del intercambio de gases en las plantas cultivadas en BIT pueden controlar mejor la pérdida de agua en el primer periodo de aclimatización (Aragón *et al.*, 2014).

La tasa de fotosíntesis fue más alta en el medio líquido que en medio semisólido. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Aragón *et al.* (2014) donde las plántulas de *Musa* AAB cv. Cemsá ¾ fueron fotosintéticamente activas a partir de los 14 días de elongación con una tasa neta de fotosíntesis de 3 a 4 veces mayor en biorreactor de inmersión temporal que en medio gelificado, que lo atribuyen a una mayor eficiencia en el uso del agua. Cabrera *et al.* (2011) reflejaron una mejor relación entre fotosíntesis y transpiración en el sistema de inmersión temporal en comparación con las plantas cultivadas en los otros sistemas de cultivo. También propagar plántulas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en el sistema de inmersión temporal favorece la tasa neta de fotosíntesis (Aragón *et al.*, 2010).

Los resultados de clorofila a, clorofila b y clorofila total fueron similares en todos los tratamientos, pero la mayor concentración se observó en BIG con 6 h de inmersión ($0.208 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$). El movimiento del medio de cultivo produce un intercambio de gases, entre ellos el etileno, por lo que lo reduce, de tal manera que favorece el aumento de la concentración de

clorofila (Silva *et al.*, 2016) como fue observado en plántulas de *Corylus* L. (Latawa *et al.*, 2015). Ramírez-Mosqueda and Iglesias-Andreu (2016) informaron que en *Vanilla planifolia* la mayor concentración de clorofila se observó en Biorreactor de Inmersión Temporal BIT® seguido de BIG.

1.5 Conclusiones

La germinación *in vitro* de las semillas de *L. aromatica* (Graham) Lindl. inició a las 8 semanas, se prolongó durante 6 semanas y fue mayor en el medio de cultivo $\frac{1}{2}$ MS. El desarrollo de las plántulas en el tratamiento de BIG con 8 h de inmersión obtuvo un 100 % de supervivencia. El sistema BIG favoreció el número de hojas, número de raíz y altura de plántula, sin embargo, las plántulas desarrolladas en el medio semisólido obtuvieron un mayor número de brotes y longitud de raíz, el índice estomático en el envés fue ocho veces mayor que en el haz, además el medio de cultivo líquido mostró la mayor tasa de fotosíntesis, sin embargo, no hubo diferencias en el contenido de clorofila.

1.6 Literatura citada

- Aewsakul, N., Maneesorn, D., Serivichyaswat, P., Taluengjit, A., & Nontachaiyapoom, S. (2013). Ex vitro symbiotic seed germination of *Spathoglottis plicata* Blume on common orchid cultivation substrates. *Scientia Horticulturae*, *160*, 238–242. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.05.034>
- Aragón, C. E., Escalona, M., Rodriguez, R., Cañal, M. J., Capote, I., Pina, D., & González-Olmedo, J. (2010). Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *46*(1), 89–94. <https://doi.org/10.1007/s11627-009-9246-2>
- Aragón, C. E., Sánchez, C., Gonzalez-Olmedo, J., Escalona, M., Carvalho, L., & Amâncio, S. (2014). Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors and gelled medium during in vitro growth and acclimatization. *Biologia Plantarum*, *58*(1), 29–38. <https://doi.org/10.1007/s10535-013-0381-6>
- Baltazar Bernal, O., Zavala Ruiz, J., Solís Zanotelli, F. Y., Pérez Sato, J. A., y Sánchez Eugenio, O. (2014). Sendero interpretativo de orquídeas y bromelias en Tepexilotla, Chocamán, Veracruz. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, Pub. Esp (9), 1687-1699. Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=263137781013>
- Bello-Bello, J. J., Spinoso-Castillo, J., and Iglesias-Andreu, L. G. (2014). Establecimiento de un sistema de biorreactores para la micropropagación de *Vainilla (Vanilla planifolia jacks. ex andrews)*. *Agroproductividad*. 63-68.
- Cabrera Jova, M., Gómez Kosky, R., & Espinosa Cuellar, E. (2011). Effect of liquid media culture systems on yam plant growth (*Dioscorea alata* L. ‘Pacala Duclos’). *BASE*. Recuperado a partir de <http://popups.ulg.ac.be/1780-4507/index.php?id=7886%3E%253B>.

- Diengdoh, R. V., Kumaria, S., Tandon, P., & Das, M. C. (2017). Asymbiotic germination and seed storage of *Paphiopedilum insigne*, an endangered lady's slipper orchid. *South African Journal of Botany*, *112*(Supplement C), 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.05.028>
- Dutra, D., Johnson, T. R., Kauth, P. J., Stewart, S. L., Kane, M. E., and Richardson, L. (2008). Asymbiotic seed germination, in vitro seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *94*(1), 11–21. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9382-0>
- Ferreira, W. de M., Vasconcelos, M. C. de, Silva, C. C. N., Oliveira, H. R. de, and Suzuki, R. M. (2017). Asymbiotic germination, multiplication and development of *Alatiglossum fuscopetalum* (Orchidaceae) as affected by culture medium, sucrose and growth regulators. *Iheringia. Série Botânica.*, *72*(1), 57–65.
- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., and Bley, T. (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences*, *14*(6), 607–621. <https://doi.org/10.1002/elsc.201300166>
- Harborne, J. 1973. *Phytochemical methods, a guide to modern techniques of plant analysis*, JB Harborne. Chapman. London.
- Hossain, M. M. (2008). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Epidendrum ibaguense* Kunth. (Orchidaceae). *African Journal of Biotechnology*, *7*(20). Recuperado a partir de <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/59389>
- Hossain, M. M., Sharma, M., Teixeira da Silva, J. A., and Pathak, P. (2010). Seed germination and tissue culture of *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl. *Scientia Horticulturae*, *123*(4), 479–487. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.10.009>

- Jiang, H., Chen, M.-C., & Lee, Y.-I. (2017). In vitro germination and low-temperature seed storage of *Cypripedium lentiginosum* P.J.Cribb & S.C.Chen, a rare and endangered lady's slipper orchid. *Scientia Horticulturae*, 225(Supplement C), 471–479.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.07.040>
- Kalimuthu, K., Senthilkumar, R., & Vijayakumar, S. (2007). In vitro micropropagation of orchid, *Oncidium* sp . (Dancing Dolls). *African Journal of Biotechnology*, 6(10).
Recuperado a partir de <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/57136>
- Kauth, P. J., Vendrame, W. A., & Kane, M. E. (2006). In vitro seed culture and seedling development of *Calopogon tuberosus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85(1), 91–102. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-9055-1>
- Knudson, L. (1946). A new nutrient solution for germination of orchid seed. *Amer. Orchid Soc. Bull.*, 15, 214–217.
- Latawa, J., Shukla, M. R., & Saxena, P. K. (2015). An efficient temporary immersion system for micropropagation of hybrid hazelnut. *Botany*, 94(1), 1–8.
<https://doi.org/10.1139/cjb-2015-0111>
- Li, H., Xu, Z., & Tang, C. (2010). Effect of light-emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 103(2), 155–163.
<https://doi.org/10.1007/s11240-010-9763-z>
- Mata-Rosas, M., Baltazar-García, R. J., Moon, P., Hietz, P., & Luna-Monterrojo, V. E. (2010). In vitro regeneration of *Lycaste aromatica* (Graham ex Hook) Lindl. (Orchidaceae) from pseudobulb sections. *Plant Biotechnology Reports*, 4(2), 157–163. <https://doi.org/10.1007/s11816-010-0132-5>
- Mata-Rosas, M., & Salazar-Rojas, V. M. (2009). Propagation and Establishment of Three Endangered Mexican Orchids from Protocorms. *HortScience*, 44(5), 1395–1399.

- Monja-Mio, K. M., Pool, F. B., Herrera, G. H., EsquedaValle, M., & Robert, M. L. (2015). Development of the stomatal complex and leaf surface of *Agave angustifolia* Haw. ‘Bacanora’ plantlets during the in vitro to ex vitro transition process. *Scientia Horticulturae*, 189(Supplement C), 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.03.032>
- Moreira, A. L., Silva, A. B. da, Santos, A., Reis, C. O. dos, & Landgraf, P. R. C. (2013). *Cattleya walkeriana* growth in different micropropagation systems. *Ciência Rural*, 43(10), 1804–1810. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782013001000012>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Quiroz, K., Saavedra, J., Vogel, H., Verdugo, G., Caligari, P. D. S., & García-González, R. (2017). In Vitro Asymbiotic Germination for Micropropagation of the Recalcitrant Terrestrial Orchid *Chloraea crispa* (Orchidaceae). *Applications in Plant Sciences*, 5(8), 1600142. <https://doi.org/10.3732/apps.1600142>
- Rabaiolli, S. M. dos S., Reiniger, L. R. S., Stefanel, C. M., Silva, K. B. da, Paim, A. F., Ziegler, A. C. da F., ... Ziegler, A. C. da F. (2017). Agar does not affect in vitro rhizogenesis and ex vitro acclimatization of *Handroanthus chrysotrichus*. *CERNE*, 23(2), 185–192. <https://doi.org/10.1590/01047760201723022289>
- Ramírez-Mosqueda, M. A., & Iglesias-Andreu, L. G. (2016). Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 52(2), 154–160. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9735-4>
- Ramos-Castellá, A., Iglesias-Andreu, L. G., Bello-Bello, J., & Lee-Espinosa, H. (2014). Improved propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a

- temporary immersion system. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 50(5), 576–581. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9602-8>
- Reyes-López, D., Quiroz-Valentín, J., Kelso-Bucio, H. A., Huerta-Lara, M., Avendaño-Arrazate, C. H., & Lobato-Ortiz, R. (2015). Caracterización estomática de cinco especies del género *Vanilla*. *Agronomía Mesoamericana*, 26(2). Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=43738993005>
- Rodrigues, L. A., Neto, P., De, V. B., Boaretto, A. G., Oliveira, J. F. de, Torrezan, M. de A., ... Otoni, W. C. (2015). In vitro propagation of *Cyrtopodium saintlegerianum* rchb. f. (orchidaceae), a native orchid of the Brazilian savannah. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 15(1), 10–17. <https://doi.org/10.1590/1984-70332015v15n1a2>
- SAS Institute Inc. (2012). *SAS version 9.4*. SAS Institute, North Carolina.
- Scheffknecht, S., Winkler, M., Hülber, K., Rosas, M. M., & Hietz, P. (2010). Seedling establishment of epiphytic orchids in forests and coffee plantations in Central Veracruz, Mexico. *Journal of Tropical Ecology*, 26(1), 93–102. <https://doi.org/10.1017/S0266467409990332>
- Silva, A. B. da, Reis, C. O. dos, Cazetta, J. O., Carlin, S. D., Landgraf, P. R. C., & Reis, M. C. dos. (2016). Effects of exogenous proline and a natural ventilation system on the in vitro growth of orchids. *Bioscience Journal*, 32(3). <https://doi.org/10.14393/BJ-v32n3a2016-31368>
- Silva, P. A. K. X. de M. e, Callegari-Jacques, S., and Bodanese-Zanettini, M. H. (2000). Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (orchidaceae) by in vitro techniques. *Ciência Rural*, 30(1), 105–111. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782000000100017>

- Srivastava, D., Gayatri, M. C., & Sarangi, S. K. (2015). In vitro seed germination and plant regeneration of an epiphytic orchid *Aerides ringens* (Lindl.) Fischer. *IJBT Vol.14(4) [October 2015]*, 14(4). Recuperado a partir de <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/34010>
- Stewart, S. L., & Kane, M. E. (2006). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(2), 147–158. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9098-y>
- Wang, H., Fang, H., Wang, Y., Duan, L., & Guo, S. (2011). In situ seed baiting techniques in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo and *Dendrobium nobile* Lindl. : the endangered Chinese endemic *Dendrobium* (Orchidaceae). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(9), 2051–2059. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0667-9>
- Yang, J. F., Piao, X. C., Sun, D., & Lian, M. L. (2010). Production of protocorm-like bodies with bioreactor and regeneration in vitro of *Oncidium* ‘Sugar Sweet’. *Scientia Horticulturae*, 125(4), 712–717. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.05.003>
- Yoon, Y.-J., Murthy, H. N., Hahn, E. J., & Paek, K. Y. (2007). Biomass production of *Anoectochilus formosanus* hayata in a bioreactor system. *Journal of Plant Biology*, 50(5), 573–576. <https://doi.org/10.1007/BF03030711>
- Zettler, L. W., Corey, L. L., Richardson, L. W., Ross, A. Y., & Moller-Jacobs, L. (2011). Protocorms of an epiphytic orchid (*Epidendrum amphistomum* A. Richard) recovered in situ, and subsequent identification of associated mycorrhizal fungi using molecular markers. *European Journal of Environmental Sciences*, 1(2). Recuperado a partir de <http://web.natur.cuni.cz/uzp/ejes/index.php/ejes/article/view/58>

CAPÍTULO 2. Sustratos y fungicidas en la aclimatización de *Lycaste aromatica*

(Graham) Lindl.

Resumen

La aclimatización en el proceso de micropropagación de plantas, es una etapa crucial, debido a que las plántulas son frágiles y, a menudo, carecen de vigor para sobrevivir. Se examinó el efecto del sistema de propagación *in vitro*, sustratos y fungicidas sobre la supervivencia y desarrollo de plántulas de *Lycaste aromatica* (Graham) Lindl, después de 6 semanas de aclimatización en un invernadero con un rango de temperatura de 20 °C a 37 °C, irradiancia de 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 70% de humedad relativa. Las plántulas se transfirieron a charolas de plástico transparente empleando un diseño completamente al azar en arreglo factorial de tres factores en los tratamiento: sistema de propagación (semisólido y biorreactor de inmersión por gravedad (BIG)), sustratos (peat moss Premier® y musgo sphagnum chileno) y fungicidas (PHC T-22®, Captan Plus® y Ridomil Bravo® 81) con medidas repetidas con tres repeticiones. La aclimatización de *L. aromatica* (Graham) Lindl. fue exitosa al obtener una supervivencia del 83 al 100% en los tratamientos del semisólido y en los tratamientos de BIG en el sustrato de musgo sphagnum chileno. En el tratamiento de BIG en el sustrato musgo sphagnum chileno más PHC T-22® se observó la mayor altura de plántula que fue de 6.8 cm. El mayor número de hojas fue de 6 y se obtuvo en el tratamiento semisólido en peat moss Premier® más PHC T-22®, el mayor número de brotes fue de 3 en el tratamiento de semisólido en peat moss Premier® y el mayor contenido de clorofila total fue de 0.43 mg g^{-1} en el tratamiento de semisólido en peat moss Premier® más Captan Plus®. La aplicación del fungicida PHC T-22® no mostró diferencias significativas al Captan Plus® o Ridomil Bravo® 81 en la supervivencia, lo cual recomienda al uso de este fungicida biológico en la aclimatización de *L. aromatica* (Graham) Lindl.

Palabras clave: BIG, orquídea, sphagnum, *Trichoderma harzianum*

CHAPTER 2. Substrates and fungicides in the acclimatization of *Lycaste aromatica* (Graham) Lindl.

Abstrac

Acclimatization in the micropropagation process of plants is a crucial phase, because the seedlings are fragile and often lack the vigor to survive. The effect of the in vitro propagation system, substrates and fungicides was tested on the survival and development of *Lycaste aromatica* (Graham) Lindl seedlings after 6 weeks of acclimatization in a greenhouse with a temperature range of 20 ° C to 37 ° C, light intensity of 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 70% relative humidity. The seedlings were transferred to transparent plastic trays using a completely randomized design in factorial arrangement of three factors in the treatments: propagation system (semisolid and gravity immersion bioreactor (BIG)), substrates (peat moss Premier® and chilean sphagnum moss) and fungicides (PHC T-22®, Captan Plus® and Ridomil Bravo® 81) with repeated measurements with three replicates. The acclimatization of *L. aromatica* (Graham) Lindl. was successful obtaining a survival of 83 to 100% in the semisolid treatments and in the BIG treatments in the substrate of chilean sphagnum moss. In the treatment of BIG in the chilean sphagnum moss substrate plus PHC T-22®, the highest seedling height was observed, which was 6.8 cm. The highest number of leaves was 6 and was obtained in the semisolid treatment in peat moss Premier® plus PHC T-22®, the highest number of shoots was 3 in the semisolid treatment in peat moss Premier® and the highest total chlorophyll was 0.43 mg g⁻¹ in the semisolid treatment in peat moss Premier® plus Captan Plus®. The application of the fungicide PHC T-22® showed no significant differences in survival to Captan Plus® or Ridomil Bravo® 81, which recommends the use of this biological fungicide in the acclimatization of *L. aromatica* (Graham) Lindl.

Palabras clave: BIG, cloud forest, orchid, sphagnum, *Trichoderma harzianum*

2.1 Introducción

La aclimatización es la etapa final de un protocolo de micropropagación, que consiste en la adaptación de las plántulas antes de pasar al invernadero o un ambiente natural (Rabaiolli *et al.*, 2017). Las plántulas *in vitro* se desarrollan en condiciones controladas de baja intensidad luminosa, alta humedad relativa y bajo intercambio de CO₂ y O₂. Es bien conocido que al transferir las plántulas de condiciones *in vitro* a *ex vitro*, generalmente hay una disminución de su tasa fotosintética (Debergh and Zimmerman, 2012) y un alto porcentaje de esas plantas micropropagadas no sobreviven al período de aclimatación (Mengarda *et al.*, 2017; Moreira *et al.*, 2013).

Las orquídeas que no tienen hojas durante la temporada seca del año y los pseudobulbos son translúcidos, la fotosíntesis debe ser del tipo metabolismo ácido de las crasuláceas y llevarse a cabo en los pseudobulbos. Las orquídeas recuperan sus hojas durante la temporada de lluvias y, durante esta época, realizan un metabolismo de carbono de tipo C₃ (Hágsater *et al.*, 2005), como *Lycaste aromatica* (Graham) Lindl.

L. aromatica (Graham) Lindl. es una especie epífita, litofítica y ocasionalmente, terrestre, que alcanza unos 50 cm de altura (Hágsater y Salazar, 1990). Sus hojas son lanceoladas, anchas, acanaladas y acuminadas (Fowlie, 1970). Los pseudobulbos de *L. aromatica* (Graham) Lindl. son ovados, comprimidos y acanalados (Scheffknecht *et al.*, 2010) y en cada extremo de la parte apical desarrollan una fuerte espina de 3 a 5 mm de largo y sus flores son triangulares y amarillo-naranjas de aroma a canela, florece a fines de primavera y principios de verano con unas 16 flores por pseudobulbo (Pridgeon, 1992). *L. aromatica* (Graham) Lindl. muestra un marcado ciclo anual en su crecimiento, es decir, requiere un período seco (de invierno a principio de primavera) que se alterna con otro período húmedo (Mata *et al.*, 2010). Periodos que coinciden con los del bosque mesófilo de montaña localizado en Chocaman, Veracruz,

México, cuya época seca inicia en noviembre y termina en mayo para dar inicio a la época húmeda.

El sustrato para orquídeas debe propiciar las condiciones físicas, como porosidad, aireación, drenaje y retención de agua, al mismo tiempo que debe garantizar las condiciones químicas y biológicas necesarias para el desarrollo de las plántulas (Macedo *et al.*, 2014). El musgo rubio *Sphagnum* en su hábitat natural conserva la humedad durante largos periodos, a pesar de estar en sitios escarpados, pues en el crecen abundantes orquídeas (Hágsater *et al.*, 2005). El sustrato *Sphagnum* es el más utilizado en la aclimatización de plantas producidas *in vitro*, porque tiene una mayor retención de agua y una textura blanda, que evitan daños en el sistema radicular de las plántulas (Macedo *et al.*, 2014).

Por ejemplo, se ha reportado un 100% de supervivencia en plántulas de *Phalaenopsis amabilis* (Venturieri and Arbieto, 2011) con sustrato de *Sphagnum*. Otro experimento reportó que al usar musgo *Sphagnum* se alcanzó un porcentaje de supervivencia del 38% con *Cattleya guttata* y del 60% con *Zygopetalum mackayi* (Manhães *et al.*, 2015). Gutierrez-Miceli *et al.*, (2008) reportaron en plántulas de *Guarianthe skinnerii* un 79% de supervivencia, con el sustrato de turba peat moss inoculado con *Trichoderma harzianum* y en semillas de *Spathoglottis plicata* Blume al inocularlas con el hongo *Epulorhiza* favoreció su germinación simbiótica (Aewsakul *et al.*, 2013). Se ha reportado que el sustrato peat moss contiene 425 mg kg⁻¹ de fósforo (P), 22.5 meq/100 g de calcio (Ca), 200 mg kg⁻¹ de amonio (NH₄) y 150 mg kg⁻¹ de nitrato (NO₃) de contenido nutrimental (Scagel, 2003).

Para obtener un mayor porcentaje de sobrevivencia de plántulas, durante la aclimatización, se utilizan fungicidas químicos como el Captan 50 Plus® (Captan N-(triclorometilto) ciclohex-4-en-1,2-dicarboximida) y el Ridomil Bravo® 81 (Metalaxil-M: (R)-2-[(2,6-dimetil-fenil)- metoxiacetilamino]-ácido propiónico metil éster) o fungicidas biológicos

como el PHC T-22® (*Trichoderma harzianum* cepa T-22 KRL-AG2). Venturieri y Arbieta (2011) reportaron que en plántulas de *Phalaenopsis amabilis* la supervivencia fue favorecida por el fungicida Manzate 800®.

En cuanto al tiempo para la aclimatización de plantas de orquídeas, se ha reportado que éste depende de la especie. Por ejemplo, en *Aerides ringens* se reportó un 80% de supervivencia a los 90 días (Srivastava *et al.*, 2015), 90% de supervivencia a los 108 días en *Cyrtopodium saintlegerianum* (Rodrigues *et al.*, 2015) y del 80% a las 8 semanas en plántulas de *Vanilla planifolia* Jacks en Biorreactor de Inmersión por Gravedad (BIG) (Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu, 2016). De acuerdo a Lando *et al.* (2016) las plántulas de *Cattleya xanthina* mostraron un contenido de clorofila decreciente al inicio de la aclimatización y a los 90 días posteriores la clorofila total fue de 0.5 mg g⁻¹.

L. aromatica (Graham) Lind. es una orquídea muy atractiva en el mercado veracruzano por su aroma agradable a canela y, por lo mismo, su población está amenazada debido a la sustracción ilegal de su hábitat. Los trabajos sobre la aclimatización de *L. aromatica* (Graham) Lind. son casi nulos, por lo que el objetivo de este estudio fue aclimatar plántulas producidas *in vitro*, evaluando el sistema de propagación, los sustratos y los fungicidas.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Material vegetal

Para este estudio se utilizaron plántulas de *L. aromatica* (Graham) Lind de aproximadamente 5 cm de longitud, propagadas *in vitro*, en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, utilizando el medio Murashige y Skoog MS (Murashige and Skoog, 1962) semisólido y para biorreactor de inmersión por gravedad (BIG) en medio MS líquido. Las plántulas se cultivaron *in vitro* durante 16 semanas bajo un fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad (56 µmol m⁻² s⁻¹) a 24±1 °C.

2.2.2 Aclimatización de plántulas

Las plántulas fueron retiradas de los frascos, se lavaron para eliminar el medio de cultivo adherido a las raíces y en charolas de plástico transparente de 14 x14 x 9 cm que contenían los diferentes sustratos, se plantaron tres plántulas por cada tratamiento (Cuadro 10) con tres repeticiones y se les aplicó un riego pesado con los diferentes fungicidas.

Cuadro 10. Tratamientos para la aclimatización de *L. aromatica* (Graham) Lindl.

| Tratamiento | Sistema | Sustrato | Fungicida |
|-------------|------------|------------------------|----------------------|
| T1 | Semisólido | Peat moss Premier®) | -- |
| T2 | Semisólido | Peat moss Premier® | PHC T-22® |
| T3 | Semisólido | Peat moss Premier® | Captan Plus® |
| T4 | Semisólido | Peat moss Premier® | Ridomil Bravo® 81 |
| T5 | Semisólido | Musgo sphagnum chileno | -- |
| T6 | Semisólido | Musgo sphagnum chileno | PHC T-22® |
| T7 | Semisólido | Musgo sphagnum chileno | Captan Plus® |
| T8 | Semisólido | Musgo sphagnum chileno | Ridomil Bravo® 81 |
| T9 | BIG | Peat moss Premier® | -- |
| T10 | BIG | Peat moss Premier® | PHC T-22® |
| T11 | BIG | Peat moss Premier® | Captan Plus® |
| T12 | BIG | Peat moss Premier® | Ridomil Bravo® 81 |
| T13 | BIG | Musgo sphagnum chileno | -- |
| T14 | BIG | Musgo sphagnum chileno | PHC T-22® |
| T15 | BIG | Musgo sphagnum chileno | Captan Plus® |
| T16 | BIG | Musgo sphagnum chileno | Ridomil Bravo® 81 |

El peat moss Premier® fue esterilizado en autoclave durante 15 minutos a 121 °C. Las charolas fueron transferidas al invernadero con un rango de temperatura de 20 °C a 37 °C, con una intensidad luminosa de 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 70% de humedad relativa de las 8:00 a las 18:00 h. Estas variables ambientales se midieron cada 30 minutos con un registrador de datos HOBO U12-012 (Onset Computer Corporation). Las charolas se mantuvieron cubiertas durante la primera semana para evitar la deshidratación durante su aclimatación.

2.2.3 Variables evaluadas y análisis estadístico

Las variables evaluadas, después del trasplante, fueron porcentaje de supervivencia, altura de planta, número de hojas y número de brotes cada dos semanas durante 6 semanas. Se empleó un diseño experimental completamente al azar con medidas repetidas en arreglo factorial en los tratamientos con tres repeticiones. Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de Tukey mediante el programa SAS versión 9.4 (SAS, 2012). El modelo experimental utilizado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \gamma_k + (\tau * \gamma)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde Y_{ijk} es la variable respuesta asociada al j -ésimo sujeto en el k -ésimo tiempo y la i -ésima combinación del tratamiento, τ_i es el efecto fijo de la i -ésima combinación del tratamiento, γ_k es el efecto del tiempo que produce el j -ésimo sujeto, $(\tau * \gamma)_{ik}$ es la interacción en el j -ésimo sujeto asignado a la i -ésima combinación del tratamiento en el k -ésimo tiempo, ε_{ijk} es el error experimental con su estructura de covarianza asociado a la medición en el tiempo k en el j -ésimo sujeto asignado a la i -ésima combinación del tratamiento.

Para extraer y determinar el contenido de clorofila a, b y total presente en las hojas a las 6 semanas se procedió de la siguiente manera. Utilizando una balanza granataria ADAM® se pesaron 0.25 g de hojas y estas se picaron finamente utilizando un bisturí; posteriormente ese material se colocó en frascos de vidrio cubiertos con papel aluminio y se le añadió 2.5 ml de acetona al 80% y los frascos se almacenaron en oscuridad a 4 °C durante 24 horas. Después la muestra se molió totalmente en un mortero, se filtró y se aforó a 6.25 ml con acetona al 80%; de esta solución se tomó una muestra de 2 mL y se colocó en una celda para leer su absorbancia a 645 y 663 nm en el espectrofotómetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific) utilizando acetona al 80% como blanco (Harborne, 1973).

La cantidad de clorofila se obtuvo por medio de las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clorofila } a = \frac{(12.7(A663)-2.59(A645))*V}{1000*P}$$

$$\text{Clorofila } b = \frac{(22.9 (A645)-4.70(A663))*V}{1000*P}$$

$$\text{Clorofila } total = \frac{(8.20(A663)-20.2 (A645))*V}{1000*P}$$

Donde A663 es la absorbancia en la longitud de onda de 663 nm, A645 es la absorbancia en la longitud de onda de 645 nm, V es el volumen aforado (ml) y P es el peso de la muestra (g).

Los datos del contenido de clorofila se analizaron en un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones y los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de Tukey mediante el programa SAS versión 9.4 (SAS 2012).

2.3 Resultados y discusión

La supervivencia fue del 83 al 100 % en todos los tratamientos del semisólido y en los tratamientos de BIG en el sustrato de musgo *Sphagnum* chileno ($p = 0.00$) y en los tratamientos donde se usó el sustrato peat moss Premier® en BIG fue del 61 al 77% (Cuadro 11). Estas diferencias posiblemente se debieron a que las plantas que crecieron en los tratamientos del semisólido son más pequeñas y la deshidratación de su follaje es menor comparado con las de BIG que son más grandes y cuya deshidratación fue mayor, a pesar de que el sustrato de peat moss Premier® conservó tanta humedad que alcanzó a dañar el meristemo y a causar la muerte. Por otra parte, los tratamientos con el sustrato de musgo *Sphagnum* chileno presentaron un mayor porcentaje de supervivencia porque el sustrato distribuya mejor humedad y su textura es blanda comparado con el peat moss Premier® (Macedo *et al.*, 2014). Los valores altos de supervivencia de este experimento coinciden con

los experimentos en plántulas de *Bletia purpurea* (Dutra *et al.*, 2008) y de *Phalaenopsis amabilis* (Venturieri and Arbiato, 2011) en el sustrato de *Sphagnum*.

En los tratamientos, con el fungicida biológico PHC T-22® tuvo diferencias significativas con los tratamientos de biorreactor en peat moss Premier®, pero dentro de estos tratamientos no hubo diferencias (Cuadro 11) por lo que el fungicida biológico PHC T-22® tuvo el mismo efecto que los fungicidas químicos Captan Plus® o Ridomil Bravo® 81 en cuanto a la supervivencia durante la aclimatización. Venturieri and Arbiato (2011) reportan que en plántulas de *Phalaenopsis amabilis* la supervivencia fue favorecida por el fungicida Manzate 800®. Los resultados del experimento son consistentes con los reportados por Gutierrez-Miceli *et al.* (2008) que, en la aclimatización de *Guarianthe skinnerii* obtuvieron un 79% de supervivencia con peat moss inoculado con *T. harzianum* y con los resultados de Srivastava *et al.* (2015), que obtuvieron un 80% al desinfectar las plántulas de *Aerides ringens* (Lindl.) con Captan, un porcentaje menor al reportado en este estudio (86%).

Para las variables de altura y número de brotes hubo un efecto significativo entre los tratamientos ($p = 0.00$ en ambos casos), pero no se observaron diferencias significativas en el número de hojas ($p = 0.054$). Sin embargo, en el semisólido, el sustrato peat moss Premier® más la aplicación de *T. harziaunum* tuvo 6 de hojas y otros que tuvieron 3 hojas. Los resultados de la altura en este experimento son confirmados por los resultados de Gutierrez-Miceli *et al.* (2008), que trabajaron con *G. skinnerii*. Los tratamientos con BIG y el musgo *Sphagnum* chileno favorecieron la altura de las plántulas.

Los tratamientos de semisólido tuvieron un efecto positivo en el número de brotes. El mejor tratamiento fue con el sustrato de peat moss Premier® sin fungicida (Cuadro 11). Sin embargo el musgo *Sphagnum* favoreció al número de hojas en dos variedades de *Phalaenopsis* (Hwang and Jeong, 2007).

Cuadro 11. Efecto promedio de los tratamientos en la aclimatización de *Lycaste aromatica*

(Graham) Lind a las 6 semanas

| Sistema | Tratamientos | | Dosis (g L-1) | S (%) | Altura (cm) | Número de hojas | Número de brotes | |
|---------------------------------|------------------------------------------|-----------------------|-------------------|----------|----------------|--------------------|---------------------|-------|
| | Sustrato | Fungicida | | | | | | |
| Semisólido | Peat-moss Premier® | Control | 0 | 91.66ab | 4.24bcde | 5.43ab | 3.08a | |
| | | PHC T-22® | 0.0135 | 86.10abc | 3.90de | 6.36a | 2.79ab | |
| | | Captan Plus® | 1 | 100.00a | 3.40e | 3.50cde | 1.52abc | |
| | | Ridomil Bravo® 81 | 1 | 94.44ab | 4.03cde | 4.81abcde | 2.38abc | |
| | <i>Sphagnum moss</i> chileno | Control | 0 | 100.00a | 4.28bcde | 3.44de | 1.41bc | |
| | | PHC T-22® | 0.0135 | 100.00a | 4.30bcde | 3.02e | 1.36bc | |
| | | Captan Plus® | 1 | 94.44ab | 5.20abcde | 5.18abcd | 1.83abc | |
| | | Ridomil Bravo® 81 | 1 | 100.00a | 4.41bcde | 4.47bcde | 2.11abc | |
| | Biorreactor de inmersión por gravedad | Peat-moss Premier® | Control | 0 | 61.10d | 5.38abcd | 4.69abcde | 1.00c |
| | | | PHC T-22® | 0.0135 | 69.44cd | 5.87abc | 3.97bcde | 1.11c |
| | | | Captan Plus® | 1 | 61.10d | 6.50a | 4.57abcde | 1.02c |
| | | | Ridomil Bravo® 81 | 1 | 77.77bcd | 5.60abcd | 4.56abcde | 1.00c |
| <i>Sphagnum moss</i> chileno | | Control | 0 | 100.00a | 6.78a | 5.36abc | 1.08c | |
| | | PHC T-22® | 0.0135 | 83.33abc | 6.86a | 5.27abcd | 1.11c | |
| | | Captan Plus® | 1 | 100.00a | 6.79a | 5.63ab | 1.13c | |
| | | Ridomil Bravo® 81 | 1 | 100.00a | 6.01ab | 5.52ab | 1.11c | |

Los valores representan la media. Medias con diferente letra entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, 0.05). Supervivencia (S).

En la semana 2 el porcentaje de supervivencia de las plantas mostró diferencias significativas en la interacción tratamiento y tiempo ($p = 0.00$). A partir de las 4 semanas posteriores al trasplante, el porcentaje de supervivencia se mantuvo estable y las plántulas se encontraron aclimatizadas, ya que a las 6 semanas se repiten los porcentajes de supervivencia en todos los tratamientos. Las plántulas provenientes del medio de cultivo semisólido en el sustrato de peat-moss Premier® más Captan Plus® y en el sustrato de musgo *Sphagnum chileno* sin

fungicida y con *T. Harzianum* o Ridomil Bravo® 81 y las plántulas provenientes de BIG en el sustrato de *Sphagnum* sin fungicida, con Captan Plus® o Ridomil Bravo® 81, mantuvieron el 100% de supervivencia en 2, 4 y 6 semanas (Figura 7). A las 6 semanas, *L. aromatica* (Graham) Lindl. mostró un rango de supervivencia de 44.44 a 100% en BIG, pero en el sustrato de musgo *Sphagnum* chileno fue de 77.77 a 100%, similar a otros estudios. A los 60 días en semisólido la tasa de supervivencia es de 31.25% en *Laelia eyermaniana* Rchb.f (Nava *et al.*, 2011) y 70% en *Brassavola tuberculata* Hook. (Mengarda *et al.*, 2017). El tiempo para la aclimatización de plantas de orquídeas depende de la especie así en *Aerides ringens* con 80% de supervivencia a los 90 días (Srivastava *et al.*, 2015) y 90% a los 108 días en *Cyrtopodium saintlegerianum* (Rodrigues *et al.*, 2015). Sin embargo en plántulas de *Phalaenopsis* provenientes del sistema de inmersión temporal la supervivencia fue de 94 % en 42 días (Hempfling and Preil, 2005), en *Musa* spp. cv. 'Grande naine' del 98.2% a los 15 días (Wilken *et al.*, 2014) y en plántulas de *Vanilla planifolia* Jacks del BIG fue del 80% a las 8 semanas (Ramírez-Mosqueda and Iglesias-Andreu, 2016), Aunque los estudios fueron en diferentes especies indican que la aclimatización es en menor tiempo favoreciendo a los sistema de inmersión temporal. Sin embargo, *L. aromatica* (Graham) Lindl., no mostró tal

tendencia.

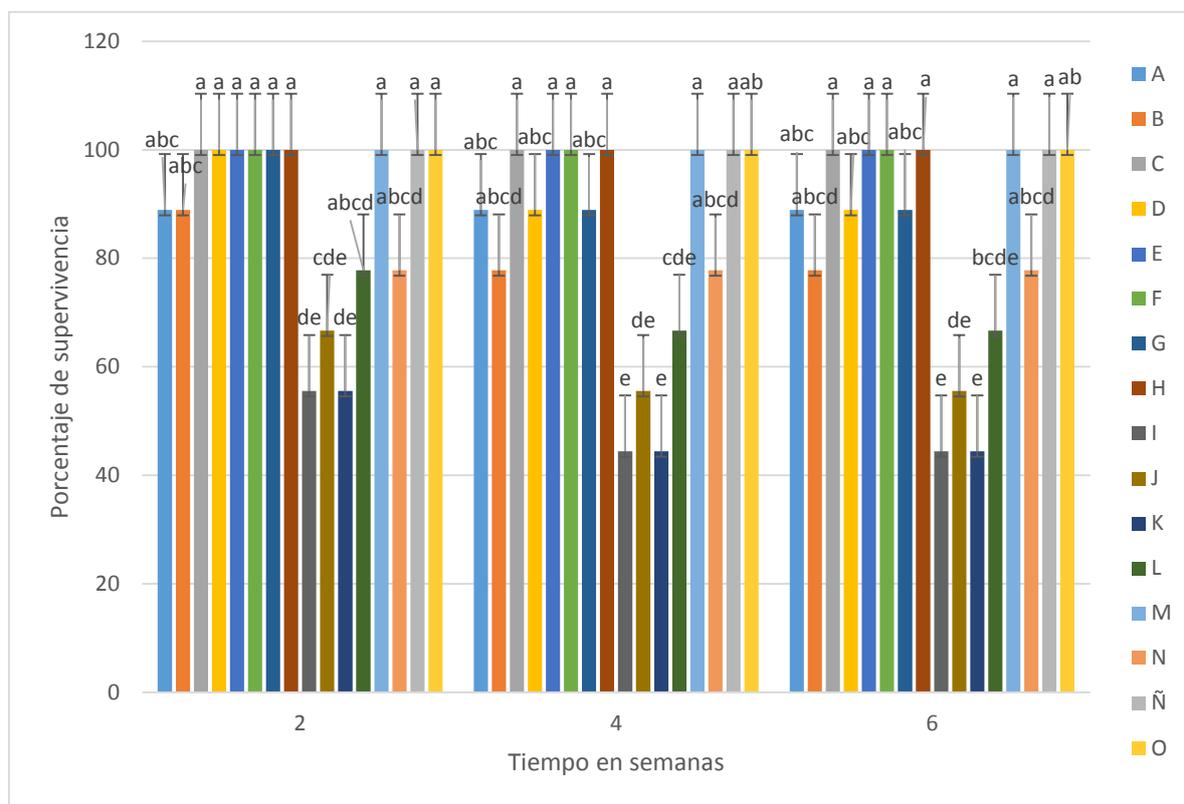


Figura 7. Supervivencia de plántulas de *Lycaste aromatica* (Graham) Lind durante 6 semanas. A (Semisólido + peat moss Premier®), B (Semisólido + peat moss Premier® + PHC T-22®), C (Semisólido + peat moss Premier® + Captan Plus®), D (Semisólido + peat moss Premier® + Ridomil Bravo® 81) E (Semisólido + musgo Sphagnum chileno), F (Semisólido + musgo Sphagnum chileno + PHC T-22®), G (Semisólido + musgo Sphagnum chileno + Captan Plus®), H (Semisólido + musgo Sphagnum chileno + Ridomil Bravo® 81), I (BIG+ peat moss Premier®), J (BIG + peat moss Premier® + PHC T-22®), K (BIG+ peat moss Premier® + Captan Plus®), L (BIG+ peat moss Premier® + Ridomil Bravo® 81), M (BIG+ musgo Sphagnum chileno), N (Biorreactor de inmersión por gravedad + musgo Sphagnum chileno + PHC T-22®), Ñ (BIG+ musgo) o y O (BIG+ musgo Sphagnum chileno + Ridomil Bravo® 81).

En el cuadro 12 se observó que la clorofila a, b, y clorofila total (TC) mostraron diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$). Los tratamientos de semisólido en el sustrato de peat-moss Premier® más Captan Plus®, semisólido en el sustrato de musgo *Sphagnum* chileno más Captan Plus®, BIG en musgo *Sphagnum* chileno más Captan Plus® y BIG en musgo *Sphagnum* chileno más Ridomil Bravo® 81 son los que presentaron mayor contenido de clorofila total (0.289 a 0.433 mg g⁻¹), que confirman que las plántulas presentan una mayor adaptación al sustrato. Los resultados son consistentes con los reportados por Lando *et al.* (2016), donde las plántulas de *Cattleya xanthina* mostraron un contenido de clorofila total de 0.5 mg g⁻¹ a los 90 días, datos más altos que *L. aromatica* (Graham) Lindl debido a que el incremento de la concentración de clorofila está en función del tiempo. Jeon *et al.* (2005) mencionan que el aumento de la concentración de clorofila a 150-200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en plántulas de *Doritaenopsis* se debe a la inducción de las enzimas de síntesis de clorofila necesarias para la biosíntesis de la clorofila.

Cuadro 12. Concentración de clorofila de plántulas de *L. aromatica* (Graham) Lind después de 6 semanas de aclimatización en el invernadero.

| Tratamientos | | Dosis | Concentración de clorofila (mg g ⁻¹) | | | |
|---------------------------------------|-------------------------------|-------------------|--------------------------------------------------|-----------|----------|--------------|
| Sistema | Sustrato | Fungicida | (g L ⁻¹) | <i>a</i> | <i>b</i> | <i>a + b</i> |
| Semisólido | peat-moss Premier® | Control | 0 | 0.100bcd | 0.060b | 0.162cdefg |
| | | PHC T-22® | 0.0135 | 0.070cd | 0.058b | 0.130efg |
| | | Captan Plus® | 1 | 0.266a | 0.163a | 0.433a |
| | | Ridomil Bravo® 81 | 1 | 0.072cd | 0.046b | 0.119efg |
| | Musgo <i>Sphagnum</i> chileno | Control | 0 | 0.090bcd | 0.051b | 0.143defg |
| | | PHC T-22® | 0.0135 | 0.064cd | 0.038b | 0.103fg |
| | | Captan Plus® | 1 | 0.188abc | 0.099ab | 0.289abcd |
| | | Ridomil Bravo® 81 | 1 | 0.118bcd | 0.062b | 0.182bcdefg |
| Biorreactor de inmersión por gravedad | peat-moss Premier® | Control | 0 | 0.105bcd | 0.051b | 0.158defg |
| | | PHC T-22® | 0.0135 | 0.107bcd | 0.058b | 0.167cdefg |
| | | Captan Plus® | 1 | 0.052d | 0.033b | 0.086g |
| | | Ridomil Bravo® 81 | 1 | 0.158abcd | 0.083ab | 0.244bcdef |
| | Musgo <i>Sphagnum</i> chileno | Control | 0 | 0.133bcd | 0.065b | 0.199bcdefg |
| | | PHC T-22® | 0.0135 | 0.177abcd | 0.083ab | 0.264bcde |
| | | Captan Plus® | 1 | 0.205ab | 0.100ab | 0.308abc |
| | | Ridomil Bravo® 81 | 1 | 0.155abcd | 0.162a | 0.319ab |

Los valores representan la media. Medias con diferente letra entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

2.4 Conclusiones

La aclimatización de las plántulas de *L. aromatica* (Graham) Lindl., provenientes de semisólido y BIG tuvieron una sobrevivencia del 83 al 100% en el sustrato musgo *Sphagnum* chileno, sin embargo, las plántulas desarrolladas en el método semisólido y aclimatizadas en el sustrato peat moss Premier® favorecieron un mayor número de brotes (1.5 a 3), además la aplicación de Captan Plus® mostró la mayor concentración de clorofila.

Respecto a los fungicidas utilizados, PHC T-22® tuvo el mismo efecto en la supervivencia que Captan Plus® o Ridomil Bravo ®81, lo cual favorece al uso de este fungicidas biológico.

2.5 Literatura citada

- Aewsakul, N., Maneesorn, D., Serivichyaswat, P., Taluengjit, A., & Nontachaiyapoom, S. (2013). Ex vitro symbiotic seed germination of *Spathoglottis plicata* Blume on common orchid cultivation substrates. *Scientia Horticulturae*, 160, 238–242. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.05.034>
- Debergh, P., & Zimmerman, R. H. (2012). *Micropropagation: Technology and Application*. Springer Science & Business Media.
- Dutra, D., Johnson, T. R., Kauth, P. J., Stewart, S. L., Kane, M. E., & Richardson, L. (2008). Asymbiotic seed germination, in vitro seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 94(1), 11–21. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9382-0>
- Fowlie, J. A. 1970. The genus *Lycaste*. Day printing corporation. Pomona, California.
- Gutiérrez-Miceli, F. A., Ayora-Talavera, T., Abud-Archila, M., Salvador-Figueroa, M., Adriano-Anaya, L., Hernández, M. L. A., & Dendooven, L. (2008). Acclimatization of Micropropagated Orchid *Guarianthe skinnerii* Inoculated with *Trichoderma harzianum*. *Asian Journal of Plant Sciences*. Recuperado a partir de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012050703>
- Hágsater, E. Salazar G.A. (ed.). 1990 Icones Orchidacearum; fascicle 1. Orchids of Mexico: part 1. Mexico DF: Asociación Mexicana de Orquideología AC, 104.
- Hágsater, E., Soto Arenas, M.A., Salazar Chávez, G.A., Jiménez Machorro, R., López Rosas, M.A. y Dressler, R.L. (2005). Las orquídeas de México. Instituto Chinoín A.C. México. 303 p.

- Harborne, J. 1973. *Phytochemical methods, a guide to modern techniques of plant analysis*, JB Harborne. Chapman. London.
- Hempfling, T., & Preil, W. (2005). Application of a temporary immersion system in mass propagation of *Phalaenopsis*. En *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation* (pp. 231–242). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5_15
- Hwang, S. J., & Jeong, B. R. (2007). Growth of *Phalaenopsis* Plants in Five Different Potting Media. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 76(4), 319–326. <https://doi.org/10.2503/jjshs.76.319>
- Jeon, M.-W., Ali, M. B., Hahn, E.-J., & Paek, K.-Y. (2005). Effects of photon flux density on the morphology, photosynthesis and growth of a CAM orchid, *Doritaenopsis* during post-micropropagation acclimatization. *Plant Growth Regulation*, 45(2), 139–147. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-0337-8>
- Lando, A. P., Wolfart, M. R., Fermino, P. C. P., & Santos, M. (2016). Structural effects on *Cattleya xanthina* leaves cultivated in vitro and acclimatized ex vitro. *Biologia Plantarum*, 60(2), 219–225. <https://doi.org/10.1007/s10535-016-0589-3>
- Macedo, M. C., Rosa, D. B. C. J., Soares, J. S., Tatara, M. B., Hoffmann, N. T. K., & Rosa, Y. B. C. J. (2014). Seed storage and acclimatization of *Brassavola tuberculata* Hook. *Semina: Ciências Agrárias*, 35(6), 2883–2894. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n6p2883>
- Manhães, N. E., Jasmim, J. M., Silva, L. A. A., Castro, B. B., Motta, N. L., Pereira, V. R., & Erthal, A. P. R. C. (2015). Loofah Fiber and Sphagnum Moss in the Acclimatization of *Cattleya guttata* and *Zygopetalum mackayi* Inoculated with Plant Growth-Promoting Bacteria. *Acta Horticulturae*, (1076), 113–118. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1076.12>

- Mata-Rosas, M., Baltazar-García, R. J., Moon, P., Hietz, P., & Luna-Monterrojo, V. E. (2010). In vitro regeneration of *Lycaste aromatica* (Graham ex Hook) Lindl. (Orchidaceae) from pseudobulb sections. *Plant Biotechnology Reports*, 4(2), 157–163. <https://doi.org/10.1007/s11816-010-0132-5>
- Mengarda, L. H. G., Cola, G. P. A., Oliveira, S. C. de, & Freitas, A. R. de. (2017). Multiplication, rooting in vitro, and acclimatization of *Brassavola tuberculata* Hook. (Orchidaceae), an orchid endemic to the Brazilian Atlantic rainforest = Multiplicação, enraizamento in vitro e aclimatização de *Brassavola tuberculata* Hook (Orchidaceae), uma orquídea endêmica da mata atlântica brasileira. *Bioscience Journal*, 33(3). <https://doi.org/10.14393/BJ-v33n3-32987>
- Moreira, A. L., Silva, A. B. da, Santos, A., Reis, C. O. dos, & Landgraf, P. R. C. (2013). *Cattleya walkeriana* growth in different micropropagation systems. *Ciência Rural*, 43(10), 1804–1810. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782013001000012>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nava, F., José, J., Jiménez-Aparicio, A. R., De Jesús-Sánchez, A., Arenas-Ocampo, M. L., Ventura-Zapata, E., & Evangelista-Lozano, S. (2011). Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de *Laelia eyermaniana* Rchb. f. generadas in vitro. *Polibotánica*, (32), 107–117.
- Pridgeon A. (1992). The illustrated encyclopedia of orchids. First edition. Timber Press. Sydney, NSW. 304 p.
- Rabaiolli, S. M. dos S., Reiniger, L. R. S., Stefanel, C. M., Silva, K. B. da, Paim, A. F., Ziegler, A. C. da F., ... Ziegler, A. C. da F. (2017). Agar does not affect in vitro

- rhizogenesis and ex vitro acclimatization of *Handroanthus chrysotrichus*. *CERNE*, 23(2), 185–192. <https://doi.org/10.1590/01047760201723022289>
- Ramírez-Mosqueda, M. A., & Iglesias-Andreu, L. G. (2016). Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 52(2), 154–160. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9735-4>
- Rodrigues, L. A., Neto, P., De, V. B., Boaretto, A. G., Oliveira, J. F. de, Torrezan, M. de A., ... Otoni, W. C. (2015). In vitro propagation of *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. f. (orchidaceae), a native orchid of the Brazilian savannah. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 15(1), 10–17. <https://doi.org/10.1590/1984-70332015v15n1a2>
- SAS Institute Inc. (2012). *SAS version 9.4*. SAS Institute, North Carolina.
- Scagel, C. F. (2003). Growth and Nutrient Use of Ericaceous Plants Grown in Media Amended with Sphagnum Moss Peat or Coir Dust. *HortScience*, 38(1), 46–54.
- Scheffknecht, S., Winkler, M., Hülber, K., Rosas, M. M., & Hietz, P. (2010). Seedling establishment of epiphytic orchids in forests and coffee plantations in Central Veracruz, Mexico. *Journal of Tropical Ecology*, 26(1), 93–102. <https://doi.org/10.1017/S0266467409990332>
- Srivastava, D., Gayatri, M. C., & Sarangi, S. K. (2015). In vitro seed germination and plant regeneration of an epiphytic orchid *Aerides ringens* (Lindl.) Fischer. *IJBT Vol.14(4) [October 2015]*, 14(4). Recuperado a partir de <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/34010>
- Venturieri, G. A., & Arbieto, E. A. M. de. (2011). Ex-vitro establishment of *Phalaenopsis amabilis* seedlings in different substrates. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 33(3), 495–501. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v33i3.3950>

Wilken, D., Gonzalez, E. J., Gerth, A., Gómez-Kosky, R., Schumann, A., & Claus, D.

(2014). Effect of immersion systems, lighting, and TIS designs on biomass increase in micropropagating banana (*Musa* spp. cv. “Grande naine” AAA). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 50(5), 582–589. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9605-5>

6. Conclusiones y recomendaciones generales

Conclusiones

La germinación *in vitro* de las semillas de *L. aromatica* (Graham) Lindl. inició a las 8 semanas y se prolongó durante 6 semanas y fue favorecida por el medio de cultivo $\frac{1}{2}$ MS.

El desarrollo de las plántulas en el sistema BIG aumenta la supervivencia, el número de hojas, el número de raíz, altura de plántula y la tasa neta de fotosíntesis.

Las plántulas provenientes de BIG y medio semisólido tuvieron una mejor sobrevivencia en el sustrato de *Sphagnum moss* chileno. Sin embargo las plántulas desarrollada en el método en medio semisólido y aclimatizadas en el sustrato Peat moss Premier® favorecen el número de brotes.

PHC T-22® tuvo el mismo efecto en la supervivencia que Captan Plus® y Ridomil Bravo®81, lo cual favorece al uso de fungicidas biológicos.

Recomendaciones

Utilizar el medio de cultivo $\frac{1}{2}$ MS que benefició el porcentaje de germinación y el sustrato musgo *Sphagnum* chileno que favoreció la aclimatización de *L. aromatica* (Graham) Lindl.

Llevar a cabo el cálculo del porcentaje de germinación para próximas investigaciones sobre *L. aromatica* (Graham) Lindl. Además, utilizar el medio de cultivo $\frac{1}{2}$ MS con gibelinas para incrementar el porcentaje de germinación

Medir la pérdida del medio de cultivo para a tener conocimiento de la absorción que tienen las plantas y adicionar Bencilaminopurina durante el desarrollo de las plántulas para aumentar la concentración de clorofila.

Aclimatar *L. aromatica*. (Graham) Lindl. con plántulas de 12 semanas de desarrollo *in vitro* para disminuir el estrés.