



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias

Desinfección y establecimiento *in vitro* de Orquídea

“*Phalaenopsis spp*”

Tesis Profesional

Para obtener el título de

Licenciado en Ingeniería Agrohidráulica

Presenta:

Alberto Angel Reyes Valderrabano

Director de Tesis

Dr. Luis Antonio Domínguez Perales

San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla, México. Diciembre 2020



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias

Desinfección y establecimiento *in vitro* de Orquídea

“*Phalaenopsis spp*”

Tesis Profesional

Para obtener el título de

Licenciado en Ingeniería Agrohidráulica

Presenta:

Alberto Angel Reyes Valderrabano

Director de Tesis

Dr. Luis Antonio Domínguez Perales

Asesores

Dr. Sigfrido David Morales Fernández

Dr. Delfino Reyes López

San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla, México. Diciembre 2020

La presente tesis titulada: **Desinfección y establecimiento *in vitro* de Orquídea “Phalaenopsis spp”** y realizada por **Alberto Angel Reyes Valderrabano**, ha sido revisada y probada por el siguiente consejo titular, para obtener el Título de:

Licenciado en Ingeniería Agrohidráulica

Facultad de Ingeniería Agrohidráulica

Consejo Particular integrado por:

Firma

Director: Dr. Luis Antonio Domínguez
Perales

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line. The signature is stylized and appears to read 'Luis Antonio Domínguez Perales'.

Asesor: Dr. Sigfrido David Morales
Fernández

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line. The signature is highly stylized and appears to read 'Sigfrido David Morales Fernández'.

Asesor: Dr. Delfino Reyes López

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line. The signature is stylized and appears to read 'Delfino Reyes López'.

San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla, México. Diciembre 2020

El presente trabajo forma parte del grupo de investigación denominado: **Agrobiotecnología y recursos naturales** y de la línea de investigación: **Biotecnología, conservación y protección vegetal.**

Dedicatoria

El siguiente trabajo de investigación lo quiero dedicar a:

Mis padres que fueron una pauta importante en cada paso de mis estudios, dedico mi trabajo a la Sra. Albertina Valderrabano Morales y al Sr. German Reyes Guarneros, quienes han estado apoyándome por conseguir una meta más. Con su amor, apoyo incondicional, las palabras correctas para seguir adelante. Asimismo, agradezco a mis hermanos quienes me mostraron el camino de seguir mejorando y ser un ejemplo a seguir para ellos.

Dedico este trabajo también a mi propio esfuerzo, a mis desvelos, mis horarios invertidos, para no darme por vencido ante cualquier adversidad y poder caminar de nuevo hacia el frente.

Por otra parte, también dedico mi trabajo a mis amigos quienes le dieron momentos a mi vida universitaria que son únicos, me demostraron que ante cualquier tropiezo siempre habrá una mano amiga que nos ayude a levantarnos y ser mejores día con día. También a mis compañeros de aula, con los que pude compartir una gran etapa de conocimientos.

De igual manera dedico mi trabajo a todas las personas que me brindaron su ayuda, sus consejos, sus enseñanzas para mejorar poco a poco mi aprovechamiento escolar, a las personas que me rodean, las cuales pudieron ver mi camino y me conocen.

Agradecimientos

Esta investigación es una recopilación de información en la cual se trabajó mediante una jornada un poco complicada debido a las circunstancias que complicaron la relación entre personas. A pesar de esta situación fue un obstáculo que hizo posible el desarrollo de nuevas herramientas para lograr el objetivo final. La importancia de que un trabajo de estudio sea interesante, es debido al camino que se toma desde que se comienza a trabajar en él, sin embargo, el motivo va acompañado de las relaciones interpersonales del investigador.

Cómo autor de esta investigación quiero comenzar a agradecer a las personas que hicieron posible el desarrollo de mis estudios, las cuales estuvieron durante todo el proceso que conlleva cierta investigación, mi padre el señor Germán Reyes Guarneros y mi madre la señora Albertina Valderrabano Morales, los cuales me han apoyado en cada decisión que te tomado a lo largo de mi vida, al igual que cada familiar que conforma mi familia y estuvieron durante este proceso con su presencia.

Por otra parte, también agradezco el apoyo brindado por mí director de investigación, el cual me ayudó tanto en las circunstancias que se me complicaban haciendo un poco más agradable el desarrollo de la investigación, al igual que a su esposa, la cual ayudo en la mayoría de las situaciones de planeación y desarrollo, al igual que en el proceso de revisión para lograr culminar este trabajo. Asimismo, me gustaría agradecer personalmente al Dr. Raúl Berdeja Arbeu, el cual no solo me brindo su amistad, sino que, me apoyo incondicionalmente para poder culminar esta investigación.

También quiero agradecer a todas las personas que me brindaron su amistad a lo largo de mis estudios, tanto a nivel superior como a lo largo de todos los estudios, mencionar de igual manera a las personas cuyos consejos me permitieron continuar desarrollar cada una de mis metas, con su carisma o entusiasmo, me ayudaron a continuar adelante, cada una de ellas son parte fundamental de mi vida, como de mi persona.

Si nada más que decir, agradezco a las personas que se interesen por tomar entre sus manos este trabajo de investigación y dedicarle unos minutos de su tiempo para poder desarrollar nuevos temas de investigación o encontrar respuestas a problemas de la vida diaria.

Índice general

Índice de Cuadros y Figuras	I
Resumen	II
Abstract	III
I. Introducción	1
II. Objetivos	3
2.1. Objetivo General	3
2.2. Objetivos Específicos	3
III. Hipótesis	4
IV. Revisión de la Literatura	5
4.1. Antecedentes	5
4.2. Importancia Mundial	6
4.3. Morfología de la planta	7
4.3.1. Raíz	7
4.3.2. Tallo	7
4.3.3. Hojas	8
4.3.4. Flor	8
4.3.5. Fruto	8
4.3.6. Semilla	9
4.4. Requerimientos de condiciones ambientales	9
4.5. Géneros cultivados como flor de corte	9
4.5.1. <i>Cymbidium</i>	9
4.5.2. <i>Cattleya</i>	9
4.5.3. <i>Phalaenopsis</i>	10
4.5.4. <i>Dendrobium</i>	10
4.5.5. <i>Vanda</i>	10
4.5.6. <i>Ascocenda</i>	10
4.5.7. <i>Paphiopedilum</i>	10
4.6. Conservación	11
4.7. Métodos de propagación vegetativa	12
4.8. Micropropagación	12

4.8.1. Propagación Sexual.....	12
4.8.2. Propagación Asexual.....	13
4.8.3. Propagación <i>in vitro</i>	13
4.9. Reguladores de Crecimiento	13
4.9.1. Auxinas.....	14
4.9.1.1. Síntesis y degradación.....	14
4.9.1.2. Transporte de auxinas	15
4.9.1.4. Mecanismos de acción.....	15
4.9.2. Giberelinas	16
4.9.2.1. Síntesis, degradación y transporte.....	16
4.9.2.2. Uso comerciales	16
4.9.3. Citocininas.....	17
4.9.3.1. Usos comerciales.....	17
4.10. Otros métodos.....	18
4.10.1. Banco de semilla	18
4.10.2. Germinación asimbiótica de semillas	18
4.10.3. Conservación <i>in vitro</i>	19
4.10.4. Técnicas de crecimiento mínimo	19
4.11. Organogénesis directa.....	19
4.12. Organogénesis indirecta	19
4.13. Embriogénesis somática.....	20
4.14. Desinfección	20
4.14.1. Posibilidad de contaminación con microorganismos	21
4.14.2. Desinfectantes	21
4.15. Trabajos de Propagación <i>in vitro</i>	22
V. Materiales y métodos.....	23
5.1. Recolección del material	23
5.2. Manejo de plantas madre	23
5.3. Manejo del laboratorio	24
5.3.1. Acondicionamiento y esterilización	24
5.3.2. Cuarto de incubación	25
5.4. Descripción de tratamientos.....	25
5.4.1.1. Colecta de explantes.....	25

5.4.1.2. Lavado y Desinfección	25
5.4.1.3. Siembra de explantes	25
5.5. Diseño experimental.....	26
5.5.1. Primera fase: Desinfección	26
5.5.2. Segunda fase: Efecto del medio y desinfección en el establecimiento	26
5.6. Variables a evaluar: primera fase.....	26
5.7. Variables a evaluar: segunda fase.....	26
5.5. Análisis estadístico	26
VI. Resultados y discusión.....	27
6.1. Primera fase: Desinfección	27
6.2. Segunda fase: Efecto del medio y desinfección en el establecimiento	32
VII. Conclusión.....	37
VIII. Bibliografía.....	38

Índice de Cuadros y Figuras

Cuadro 1. Análisis de varianza para las variables evaluadas bajo las condiciones de bicloruro de mercurio (HgCl₂).....	27
Cuadro 2. Comparación de medias para las variables bajos las concentraciones de bicloruro de mercurio (HgCl₂).....	28
Cuadro 3. Análisis de varianza para las variables respuesta a las concentraciones de bicloruro de mercurio (HgCl₂) y Picloram.	32
Cuadro 4. Comparación de medias en todos los tratamientos con las variables evaluadas	33
Cuadro 5. Comparación de medias para la variable respuesta en concentraciones de HgCL₂.	34
Figura 1. Macrolocalización de Tenango de las Flores	23
Figura 2. Macrolocalización de la Facultad de Ingeniería Agrohidráulica	24
Figura 3. Niveles de fenolización (baja, media, alta) en explantes de hoja de Phalaenopsis desinfectados con tres concentraciones de bicloruro.	30
Figura 4. Relación de porcentaje de supervivencia de explantes y porcentaje de pérdida de explantes, empleando tres concentraciones de HgCl₂ como agente desinfectante... 30	30
Figura 5. Relación del porcentaje de supervivencia y el porcentaje de pérdida en explantes, empleando tres concentraciones de HgCL₂ adicionado con picloram.....	36

Resumen

La familia Orchidaceae constituye uno de los grupos de plantas más diversos, con alrededor de 25 mil especies conocidas a nivel mundial (Chase *et al.*, 2003) y (Dressler, 2005). México, situado en el límite norte del trópico americano, contiene una notable riqueza de orquídeas que han sido registradas en 1260 especies y 170 géneros (Hágsater, *et al.*, 2005) y (Soto, *et al.*, 2007). En sus hábitats nativos, la germinación se lleva a cabo sólo cuando ciertos hongos están presentes y abastecen de azúcares a la semilla en germinación hasta que la semilla tiene suficiente clorofila para producir sus propios azúcares y alimentarse a sí misma (Larzon, 2004). Por ello varias formas de multiplicación clonal *in vitro* han sido desarrolladas, dentro de las cuales la más exitosa ha sido el uso de segmentos del eje floral (Scully, 1966, Arditti *et al.*, 1975, Arditti y Ernst, 1993) y en menor grado de segmentos de hojas (Tanaka y Sakanishi, 1977, Arditti y Ernst, 1993). El cultivo de tejidos es una herramienta que ha sido de gran utilidad para resolver problemas adversos en diferentes especies vegetales, sin embargo, uno de los principales problemas de la propagación *in vitro* que se presentan cuando se tratan de establecer los cultivos es la contaminación de los mismos con diversos tipos de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, fitoplasmas, virus). El ambiente generado por explante, medio de cultivo y condiciones físicas de incubación es altamente propicio para la proliferación de muchos de estos microorganismos que pueden provocar la destrucción de cultivos. (Levitus, *et al.*, 2010) Con el fin de reducir la problemática de contaminación durante el establecimiento *in vitro*, se evaluaron tres concentraciones del agente desinfectante bicloruro de mercurio (HgCl_2): $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Encontrando diferencias estadísticas altamente significativas con ($P \leq 0.01$) en las variables de contaminación por hongos y bacterias, por otra parte, se encontró una diferencia significativa con ($P \leq 0.05$) en el porcentaje de pérdida de explante, en cuanto a las variables supervivencia, baja fenolización en el medio y media fenolización, no se encontraron diferencias estadísticas significativas. Al no haber pérdidas totales reportadas, el uso de bicloruro como desinfectante es una alternativa para el establecimiento *in vitro* de explantes de la especie y acondicionarlo a especies similares.

Palabras clave: propagación, *Orchidaceae*, establecimiento, desinfección, bicloruro de mercurio.

Abstract

The Orchidaceae family constitutes one of the most diverse groups of plants, with around 25 thousand known species worldwide (Chase et al., 2003) and (Dressler, 2005) Mexico, located at the northern limit of the American tropics, contains a remarkable richness of orchids that have been recorded in 1260 species and 170 genders (Hágsater, et al., 2005) and (Soto, et al., 2007) . In their native habitats, germination takes place only when certain fungi are present and supply sugars to the germinating seed until the seed has enough chlorophyll to produce its own sugars and feed itself (Larzon, 2004). For this reason, several forms of clonal multiplication in vitro have been developed, among which the most successful has been the use of segments of the floral axis (Scully, 1966, Arditti et al., 1975, Arditti and Ernst, 1993) and to a lesser extent degree of leaf segments (Tanaka and Sakanishi, 1977, Arditti and Ernst, 1993) Tissue culture is a tool that has been very useful to solve adverse problems in different plant species, however, one of the main problems of the In vitro propagation that occurs when trying to establish cultures is their contamination with various types of microorganisms (fungi, yeasts, bacteria, phytoplasmas, viruses). The environment generated by the explant-culture medium-physical incubation conditions is highly conducive to the proliferation of many of these microorganisms that can cause the destruction of cultures. (Levitus, et al., 2010) In order to reduce the contamination problem during in vitro establishment, three concentrations of the disinfecting agent mercury dichloride (HgCl_2) were evaluated: $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Finding highly significant statistical differences with ($P \leq 0.01$) in the variables of contamination by fungi and bacteria, on the other hand, a significant difference was found with ($P \leq 0.05$) in the percentage of loss of explant, in terms of survival variables , low phenolization in the medium and medium phenolization, no significant statistical differences were found. As there are no reported total losses, the use of dichloride as a disinfectant is an alternative for the in vitro establishment of explants of the species and conditioning it to similar species.

Keywords: propagation, Orchidaceae, establishment, disinfection, dichloride of mercury.

I. Introducción

En la familia que constituyen las Orchidaceae (Chase *et al.*, 2003) y (Dressler, 2005) se han encontrado alrededor de 25 mil especies alrededor del mundo, logrando una distribución por todos los continentes sin contar la Antártida, teniendo una mayor concentración solo en regiones tropicales de México, justo en el borde norte del trópico americano, quedando con un registro de 1260 especies en 170 géneros (Hágsater, *et al.*, 2005) y (Soto, *et al.*, 2007).

La planta de la orquídea, como la mayoría de las cosechas florales, pueden ser propagadas ya sea sexual o asexualmente. Y que la mayor parte de las orquídeas no son fieles a su tipo si vienen de semilla, toda la propagación futura debe ser con medios asexuales para asegurar que la descendencia sea fiel a su tipo. Las orquídeas se propagan asexualmente con varios medios que no se utilizan comúnmente para incrementar otras especies florales. Una de las problemáticas en su propagación es la semilla. Puesto que, las semillas no tienen endospermo y son difíciles de hacerlas germinar. En sus hábitats nativos, la geminación se lleva a cabo sólo cuando ciertos hongos están presentes y abastecen de azúcares a la semilla en germinación hasta que la semilla tiene suficiente clorofila para producir sus propios azúcares y alimentarse a sí misma (Larzon, 2004).

Debido a que la división por pseudobulbos, es un proceso de propagación muy lento, en el cual se busca probar el método de propagación *in vitro*, probando con diferentes porciones de la planta (tallos, semillas, hojas, etc.). En este caso, para la propagación por cultivo de tejidos se debe conocer perfectamente la biología de la reproducción de la planta para aprovechar aquellos explantes que en forma natural son propágulos. En cambio, si se pretende micro propagar mediante el empleo de semillas sintéticas el explante original deberá posibilitar la inducción de la embriogénesis somática. En este caso, la utilización de embriones zigóticos inmaduros u hojas, suelen ser frecuentes como explantes. La embriogénesis somática es el proceso a través del cual las células somáticas de las plantas se convierten en embriones, los cuales son capaces de germinar y desarrollarse hasta producir plantas completas. Este fenómeno puede apreciarse de manera natural en muchas especies; sin embargo, fue a finales de los años 50's que pudo reproducirse bajo condiciones de laboratorio por dos grupos independientes. Esta capacidad de las células somáticas de las plantas cultivadas *in vitro* de formar embriones de forma similar a la embriogénesis cigótica

es una de las características más interesantes de las plantas y el mejor ejemplo del concepto de totipotencia, que señala que toda célula viviente normal posee la capacidad de regenerar un organismo completo (Cerdeña, 2001).

Un desafío persistente que surge al intentar establecer cultivos es la contaminación de los mismos con diversas categorías de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, fitoplasmas, virus). El entorno creado por el procedimiento de (explantar y medio de cultivo, junto con las condiciones físicas de incubación) es altamente propenso a facilitar la propagación de muchos de estos microorganismos, lo que puede llevar a la pérdida de los cultivos. En los casos más favorables, estos microorganismos no causan la destrucción directa de los cultivos, pero sí compiten por los nutrientes del medio de cultivo o alteran su entorno. Conseguir cultivos completamente libres de contaminación es complicado, ya que en la mayoría de los casos es altamente probable que incluyan virus y fitoplasmas. En la práctica, cuando se mencionan cultivos asépticos, generalmente significa que son cultivos en los que no hay proliferación de hongos y bacterias. (Levitov, *et al.*, 2010). Debido a lo anterior y con la finalidad de lograr un proceso de desinfección adecuado para la especie, se plantearon los siguientes objetivos.

II. Objetivos

2.1. Objetivo General

Establecer una metodología de desinfección para la propagación y establecimiento *in vitro* de Orquídea “*Phalaenopsis spp*”

2.2. Objetivos Específicos

- ❖ Evaluar la concentración de bicloruro de mercurio en el establecimiento *in vitro* a partir de segmentos de hoja.
- ❖ Determinar el efecto de la concentración de Picloram en el desarrollo de explantes de Orquídea “*Phalaenopsis spp*”.

III. Hipótesis

El uso de bicloruro de mercurio en concentraciones de 0.3% tiene un efecto positivo en el establecimiento *in vitro* de *Phalaenopsis spp.*

El proceso de desinfección y en el medio de cultivo, en el establecimiento *in vitro* influyen en el desarrollo de explantes de Orquídea “*Phalaenopsis spp.*”.

IV. Revisión de la Literatura

4.1. Antecedentes

El cultivo de orquídeas no es nuevo, Confucio (551 – 479 a.C.) llegó a mencionar las orquídeas en sus escritos, en ellos llegó a mencionar la fragancia que se desprende de ellas al ser domesticadas y ser utilizadas como decoración en hogares. Por otra parte, el desarrollo en el cultivo de las orquídeas pasó de ser un simple pasatiempo a convertirse a una producción comercial. En Grecia y Roma fueron utilizadas por sus características medicinales y no por sus propiedades ornamentales. Durante principios del siglo XVIII los capitanes de barcos, misioneros botánicos comenzaron a introducir orquídeas a Inglaterra de todas partes del mundo siendo estas un simple presente para sus inversores. Mientras tanto, durante la floración de estas plantas exóticas, se obtenía respaldo para su promoción mediante un envío no oficial por parte de coleccionistas expertos a lugares lejanos del globo. Sin embargo, no fue sino hasta el año de 1821 cuando Conrad Loddiges y sus hijos dieron inicio a la producción comercial de orquídeas, cultivándolas en su invernadero ubicado en Hackney muy cerca de Londres, donde nació la industria de la orquídea. Conrad Loddiges comenzó a producirlas para su venta a los nobles provincianos que podían pagar la construcción de los invernaderos necesarios para cultivarlas (Withner, 1959).

Existen países que cuentan con riqueza de especies, la mayoría de estos se encuentran entre los trópicos de Cáncer y Trópico de Capricornio, un ejemplo de ello lo es México, lo que tiene en una gran preocupación es su extinción de especies. Los bosques húmedos de montaña se representan como el 1% del territorio nacional, concentrando aproximadamente un 60% de las especies conocidas de estas y con más amenaza. El tráfico ilegal de especies es un crimen mundial siendo únicamente usadas para él comercio; mientras que el comercio legal, se fundamenta únicamente en conocimientos científicos, un ejemplo muy claro de esto es la biotecnología, el mejoramiento genético y la horticultura. Dejando como opción que cualquier forma de conservación es válida legal o ilegalmente puesto que es necesaria para la preservación. Dejando muy claro que la divulgación acerca de la ciencia de las orquídeas debe dirigirse a toda los rasgos de la sociedad, pues el conocimiento puede constituir una forma eficaz para su conservación en las posteridad. (Iñiguez, 2017).

Las plantas más vulnerables dentro de la gran familia de angiospermas (plantas con flores) son las orquídeas, entre los factores que destacan más es la sobreexplotación del medio silvestre, el tráfico ilegal, cambio climático, posicionando su importancia en la preservación por la amplia combinación en su intrincada red de sus dependencias bióticas y abióticas, (Dressler, 1993). Siendo una de las especies ampliamente usadas como tema principal en los debates de conservación.

4.2. Importancia Mundial

China se posiciona como uno de los países que posee un mayor número de plantas vasculares, ocupando la segunda posición con un total de 1388 especies en 194 géneros, incluyendo 11 de estos endémicos. Aunque enfrenta un serio problema dentro de su región tropical por el monocultivo del caucho (*Hevea brasiliensis*) presentando un severo cambio de suelo, por otra parte, aproximadamente la cuarta parte de sus especies es utilizada en la medicina tradicional y en suplementos alimenticios (Huang, 2011).

En Tailandia se cuenta con 1230 especies, con 170 géneros los que se complementan de 150 endémicos. (Nanakorn & Indharamusika , 1999). Sin embargo, la mayoría de estas especies se encuentran en peligro de extinción, llegando a requerir opciones extremas en el tema de la conservación y un buen uso sustentable en sus especies (Thammasiri, 2008).

Indonesia, es otro de los países asiáticos que cuentan con una amplia biodiversidad, llegando a identificar 197 especies, a pesar de esto se presenta un gran riesgo biológico para sus especies con la eliminación acelerada en su entorno, sobreexplotación y pérdida de su hábitat. (Budiharta, *et al.*, 2011)

Nepal reporta dentro de sus orquídeas silvestres 458 especies, con 18 de estas endémicas. Frenando sus amplios intentos por la conservación, la sobreexplotación y la pérdida de su hábitat, ha sido favorable su uso para su propia sustentabilidad. (Subedi *et al.*, 2013).

Dentro de los países que cuentan con una gran cantidad de especies es Madagascar, con 1,000 de estas silvestres que preservan en parques y reservas públicas o privadas. Debido al enorme problema de la pobreza en estado extremo, ha obligado a reducir zonas boscosas para la implementación de cultivos para su subsistencia propia. (From *et al.*, 2005).

En América, Colombia y Ecuador se comparte la mayor cantidad de orquídeas, contando con 9,000 especies, y 3,000 endémicas, donde a pesar de su importancia lucha contra la destrucción de los bosques Andinos. Sus programas de conservación concientizan a la población, para lograr un balance ecológico y social (Orejuela, 2012).

México, estando dentro de los países intertropicales, enfrenta problemas con la preservación de orquídeas como: tráfico ilícito, pérdida de bosques, conversión de tierras para agricultura y ganadería, expansión urbana y alteraciones climáticas (Nájar, 2011) Al comparar con otros países las distintas especies que se cuentan con otros países tropicales, es reconocida debido a la presencia de numerosos recolectores que exploraron México en el siglo XIX o a investigaciones vinculadas al equipo del Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología (AMO), (Hágsater y Soto , 1998).

4.3. Morfología de la planta

4.3.1. Raíz

Se constituye por un tejido de células especializadas capaces de alimentarse y obtener agua de la atmósfera. Sus raíces tienen la capacidad de sostenerse con gran fuerza sobre cualquier superficie de epidermis arbórea e incluso macetas; sin importar su material o longitud que lleguen a manifestar, esto es se debe a su tejido esponjoso llamado velamen por logrando la adquisición de agua y nutrientes adaptándose a su entorno (Cortez, 2013).

Cuando las circunstancias no favorecen al tejido esponjoso con estructura similar a los alvéolos de una colmena, este puede cerrarse para prevenir la pérdida de agua. La extremidad de la raíz o caliptra es afilada y presenta un tono verde, transformándose en un tono más claro a medida que se desarrolla, dando lugar al tejido esponjoso llamado velamen. La raíz surge desde la parte inferior del tallo al romper la cubierta de la envoltura en la hoja para nutrirse. (Cortez, 2013).

4.3.2. Tallo

La orquídea *Phalaenopsis* tiene un crecimiento monopoidal, llegando a aumentar su tamaño a partir de una sola yema apical. Este posee de un tallo de crecimiento monopoidal incapaz de generar yemas axilares. Es de color verde y está recubierto por las vainas de las hojas, es de entrenudos cortos y puede llegar a medir hasta 60 cm. de altura. Con el paso del tiempo este tallo llega a lignificarse (Cortez, 2013).

4.3.3. Hojas

Son suculentas y de tono verde intenso, experimentando una transformación cromática hacia una variante rojiza o púrpura dependiendo de las condiciones de su entorno de cultivo. Sus nervaduras se llegan a presentar en forma paralela y vertical. (Cortez, 2013).

El pecíolo tiene forma de vaina que llega a envolver el tallo de la planta. Las hojas tienen la capacidad de alcanzar dimensiones que oscilan entre los 20 a 30 cm. de longitud, mientras que su ancho llega a variar de 10 a 15 cm; con la única función de almacenar agua. (Cortez, 2013).

4.3.4. Flor

La flor de las Phalaenopsis, al igual que otras orquídeas, exhibe simetría bilateral, lo que significa que se pueden apreciar dos capas: la primera consta de tres pétalos, mientras que la segunda está compuesta por tres sépalos. En el interior de la capa interna, hay una estructura que difiere en forma y color en el centro, la cual es un pétalo modificado conocido como labelo. En el interior de los sépalos y pétalos, se ubica una columna que alberga los órganos femeninos (Estigma) y masculinos (Polínea). Los pétalos exhiben diversas tonalidades de color, presentándose en tonos como morado, blanco, amarillo y en varias combinaciones (Cortez, 2013).

Estas flores se mantienen sostenidas por un eje floral denominado o pedúnculo, el cual es ramificado y surge desde el tallo. El eje floral se compone de segmentos cortos y espacios más largos que pueden generar yemas florales, que se inducen al podar los pedúnculos después de la floración principal. Dependiendo de la edad y del cuidado, un eje floral tiene la capacidad de generar entre 25 y 40 flores. Cada planta puede producir de 1 a 3 ejes florales anualmente (Cortez, 2013).

4.3.5. Fruto

Es una cápsula cilíndrica de color verde, longitudinalmente posee nervaduras llamadas nervarios y mide de 10 a 15 cm. de largo, es lampiño y dehiscente. Cuando llegan alcanzar su madurez fisiológica sus nervarios se abren dejando escapar sus semillas que llegan a ser de 5,000 a 20,00 semillas, dependiendo de la edad, nutrición, factores ambientales, para al final poder ser transportadas por el viento (Cortez, 2013).

4.3.6. Semilla

Las semillas son de color blanco amarillento, son alargadas y aplanadas, se encuentran dentro del fruto protegidas por un fino polvillo y un tejido algodonoso de igual color. Para recolectar las semillas es importante que el fruto este totalmente maduro, el cual debe guardarse en un frasco de vidrio o en una bolsa plástica la cual debe de amarrarse para evitar que estas se caigan (Cortez, 2013).

4.4. Requerimientos de condiciones ambientales

Para lograr un buen establecimiento de las orquídeas *Phalaenopsis*, es importante tomar en cuenta las condiciones ambientales que requiere en cada una de sus etapas de desarrollo en su ciclo vegetativo. Debido a su lugar de origen la orquídea *Phalaenopsis* llega a crecer naturalmente en áreas oscuras recubiertas de árboles que no hacen tan fácil el acceso de os rayos solares. Aunque su lugar de origen llega a ser un clima húmedo y cálido, ha demostrado adaptarse a diferentes climas (Cortez, 2013).

4.5. Géneros cultivados como flor de corte

Una amplia variedad de género de orquídeas se cultiva como flor de corte. Las cifras varían de un país a otro y en algunos casos de un lugar a otro dentro del país, según sus condiciones climáticas. Se enumeran algunos de los géneros más conocidos (Mijail, 2011).

4.5.1. *Cymbidium*

Cymbidium es nativo de Asia y las Filipinas. Las especies e híbridos cultivados son del tipo fresco que requieren 10 °C de temperatura nocturna para su floración. Las flores se cultivan básicamente para comercio de primavera, cuando sus tonos pastel son los más apropiados. Presentándose las flores todo el año ya que los floricultores en Australia abastecen a los mercados del norte durante la primavera australiana cuando las plantas en los Estados Unidos son vegetativas (Mijail, 2011).

4.5.2. *Cattleya*

Nativo de los trópicos de Centro y Sudamérica, el género *Cattleya* tiene más de 50 especies y miles de híbridos. Las plantas, especies e híbridos pueden ser seleccionados para dar al floricultor flores cada mes del año. Algunas especies y sus híbridos responden al fotoperiodo y pueden florecer dos veces al año. Los colores varían desde el blanco a varios

matices de lavanda, amarillo y rojo. Los bicolors, con blanco y pétalos púrpura y amarillo con pétalos púrpura están disponibles. La talla de la flor varía de 6 a 15 cm (Mijail, 2011).

4.5.3. *Phalaenopsis*

Estas orquídeas, nativas de Asia, Filipinas e Indonesia, son muy populares para los ramos de novia. Las flores blancas, los híbridos de *Phalaenopsis amabilis*, están disponibles todo el año ya que estas plantas se pueden mantener floreciendo continuamente. El rosa y otros colores están disponibles en otoño y primavera (Mijail, 2011).

4.5.4. *Dendrobium*

Nativas de la cuenca del Pacífico occidental se cultivan mucho por sus racimos que duran un largo tiempo como flor de corte. Tailandia, Singapur y Hawái son los mayores productores de racimos de *Dendrobium*. Un racimo típico de Tailandia es cortado cuando tiene 7 flores y 7 capullos. La mayor parte de la producción de Tailandia y Singapur se envía a Alemania. Este género tan amplio, como una gran variedad de colores, tamaños y formas en las flores, tiene mucho potencial todavía sin utilizar para la producción de flor de corte (Mijail, 2011).

4.5.5. *Vanda*

Estas son nativas del sudeste de Asia y han sido plantas populares desde hace mucho tiempo. Probablemente la más conocida es (*Vanda miss Joaquín*), que ha utilizado en los “leis” (collares de flores hawaianos) durante muchos años. También se usó mucho como flor de promoción. Los racimos de flor *Vanda* se cultivan en Singapur, Tailandia y Hawái y están disponibles durante todo el año en una gama extensa de tamaños y colores (Mijail, 2011).

4.5.6. *Ascocenda*

Estos híbridos de *Vanda* y *Ascocentrum* nos recuerdan a bandas en miniatura y tienen una excelente vida. Actualmente, la mayor parte de la producción de flor de corte se en Tailandia y todas las flores se envían a Alemania. Se han reportado en rendimientos de hasta 150 inflorescencias o espádices m²/año (Mijail, 2011).

4.5.7. *Paphiopedilum*

Las orquídeas como chinelas de dama, nativas del sudeste de Asia han sido desde hace mucho tiempo flores de corte muy populares en Europa y el norte de los Estados Unidos. La

mayor parte de esos cultivos son híbridos de especies como la *Paphiopedilum insigne* y requieren noches frescas (10 °C) para una mejor floración, de modo que la producción está limitada a los climas más templados (Mijail, 2011).

4.6. Conservación

Se enfoca en alcanzar la preservación de los genes o genotipos de plantas fuera de su entorno natural, con el propósito de su utilización en el presente o en el futuro. La conservación ex situ es una de las diversas acciones significativas que constituyen la gestión de los recursos fitogenéticos. Llegando a complementar la estrategia de conservación in situ (Iriundo, 2011).

Cuando se trata de un entorno diferente al hábitat natural de las especies, estas suelen ser conservadas principalmente fuera de su ubicación original, en bancos y colecciones de material genético. Este proceso implica diversas etapas y procedimientos, los cuales demandan la implementación de técnicas adecuadas y la intervención de personal capacitado. Aunque se reconoce que la protección directa de los hábitats es el enfoque más efectivo y eficiente para la conservación, se acepta que las técnicas de conservación ex situ desempeñan un papel crítico dentro de un programa de conservación global (Iriundo, 2011).

Otras alternativas para la conservación fuera del hábitat natural incluyen: los depósitos de material genético en forma de ADN, polen y yemas. Las técnicas de Micropropagación son particularmente atractivas para la prolongación y preservación de las orquídeas, ya que permiten obtener tasas de multiplicación significativamente altas utilizando una cantidad inicial mínima de material.

Esta metodología ha sido aplicada en instalaciones de producción y en instituciones científicas. La germinación de semillas de orquídeas en un ambiente controlado en laboratorio se ha convertido en un importante componente del programa de conservación, siendo más destacado en la producción de híbridos de interés comercial, representando así una opción factible para la multiplicación en gran escala de orquídeas en peligro. (Halbinger y Soto, 1997).

4.7. Métodos de propagación vegetativa

La multiplicación o propagación vegetativa consiste en generar una planta a partir de una célula, tejido, órgano o fragmento de una planta madre. (González, 2019) aborda esta técnica de multiplicación de plantas, la cual es ampliamente empleada por los agricultores. En este método, no se requiere utilizar semillas para obtener una nueva planta, sino que se aprovecha la capacidad que ciertas plantas tienen para separar una porción de sí mismas y desarrollar así una nueva planta de manera autónoma.

4.8. Micropropagación

Los métodos de micro propagación son vitales para la propagación clonal o sexual en grandes cantidades libres de cualquier tipo de contaminación, gracias a estos pueden obtenerse plantas libres de algún patógeno dañino a través de cultivo de meristemos. (Irawati, 2013)

4.8.1. Propagación Sexual

Las semillas de las orquídeas, no contienen endospermo, que es la sustancia de reserva de alimento. En su entorno natural, las cápsulas de las semillas de orquídeas se abren cuando maduran, siendo transportadas por el viento. Si caen en un ambiente propicio para la germinación, pueden desarrollarse y crecer. Sin embargo, (Serna, 1999) sostiene que estas semillas tienen bajas probabilidades de supervivencia, ya que numerosas especies de orquídeas solo pueden prosperar en compañía de un hongo simbiótico como lo es *Rhizoctonia spp.*

Cada semilla contiene una envoltura que protege un embrión primitivo no especializado y sencillo, compuesto por alrededor de 100 a 200 células y sin la presencia de endospermo. (Mitchell, 1989) detalla que, debido a la carencia de reservas de nutrientes, el proceso de germinación y el consecuente crecimiento de las orquídeas están condicionados a la simbiosis con un hongo que suministra los componentes esenciales para este proceso. Se indica que cuando el fruto logra abrirse de manera natural, liberando así las semillas son liberadas, la germinación dependerá de que al caer se logre el contacto con el hongo, posibilitando así que el embrión penetre mediante una célula suspensora de mayor tamaño; el hongo se desarrolla en el interior de las células del embrión, que posteriormente es asimilado por la orquídea, acelerando su crecimiento para originar un protocormo.

4.8.2. Propagación Asexual

En la reproducción vegetativa no habrá diversidad genética en las plantas que se desarrollen, estas serán exactamente iguales a la planta madre de la cual se extrae la porción vegetativa. Por lo tanto, si el objetivo es obtener copias genéticas, este método resulta ser la selección apropiada (Lee, 2008) asegura que para llevar a cabo este tipo de propagación se puede de dos formas:

- ❖ Propagación manual
- ❖ Por división de las plantas fraccionando el número de pseudobulbos y sembrándolos en un sustrato adecuado.

Afirmando así que no todas las orquídeas se llegan a dividir de las mismas formas.

4.8.3. Propagación *in vitro*

La propagación mediante cultivo *in vitro* implica la siembra de meristemos u otras partes de la planta en un medio de cultivo preparado en un laboratorio. El término “cultivo *in vitro*” se emplea para describir los cultivos vegetales asépticos, los cuales ofrecen ventajas adicionales en comparación con los métodos convencionales de reproducción. Estas ventajas incluyen la capacidad de germinar semillas que no germinarían en condiciones de semillero y la posibilidad de lograr una rápida multiplicación a partir de pequeñas secciones de la planta libres de patógenos (Fay, 1994).

(Fhan, 1982) por otra parte, dice que con el fin de alcanzar la reproducción de plantas a través del cultivo *in vitro*, es factible emplear diversas porciones de vegetación, tales como tallos, secciones de flores, fragmentos de hojas, meristemos, células en suspensión y otros materiales biológicos similares denominando a estos con el término de explantes. Mediante el uso de explantes es factible inducir la morfogénesis, que se refiere al conjunto de procesos relacionados con la diferenciación y desarrollo de órganos o tejidos para dar una planta completa.

4.9. Reguladores de Crecimiento

En la mayoría de los casos, las células en crecimiento tienden a experimentar división y alargamiento celular debido a la influencia de diversas hormonas. Sin embargo, en situaciones, especialmente en condiciones de cultivo *in vitro*, se ha notado que estas células

pueden iniciar procesos de especialización en ciertos niveles hormonales. Un ejemplo de esto es la producción de componentes xilemáticos. (Jordán y Casarreto, 2006).

De manera que, como citan (Jordán y Casarreto, 2006) las células de las plantas que presentan un núcleo y exhiben un nivel de especialización moderado, tienen la capacidad de regresar a su estado meristemático bajo ciertas condiciones y así lograr dar distintas respuestas que finalmente conducen a la formación de órganos y plantas. Siendo usada la ciencia y la tecnología posibilitan la regeneración en gran cantidad de plantas fértiles a partir de células en un entorno controlado en el laboratorio, logrando avances importantes en ingeniería genética. Esto resulta en la producción de plantas alteradas mediante la incorporación y codificación de inserciones en células, lo que permite que estas plantas viables expresen su genética y se reproduzcan de manera fiel. Esto resalta el potencial de la biotecnología que surge de la capacidad total de regeneración de células vegetales.

4.9.1. Auxinas

Las auxinas constituyen un grupo de hormonas vegetales naturales que controlan diferentes aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas. La variante más destacada en las plantas es el ácido indolacético (IAA), el cual es altamente activo en pruebas biológicas y se encuentra comúnmente en concentraciones nanomolares. Otros tipos naturales de auxinas comprenden el ácido 4-cloro-indolacético (4-ClIAA), ácido fenilacético (PAA), ácido indol butírico (IBA) y el ácido indol propiónico (Ludwig & Cohen, 2002).

4.9.1.1. Síntesis y degradación

La producción de IAA (ácido indol acético) tiene lugar principalmente en meristemas apicales, hojas en fase temprana y frutos que están en proceso de desarrollo. Las plántulas de *Arabidopsis* tienen la capacidad de generar IAA en las hojas, cotiledones y raíces, siendo las hojas jóvenes las que poseen la mayor habilidad sintética. A pesar de que se tiene conocimiento de que las plantas emplean diversas vías para sintetizar IAA, aún no se ha logrado una descripción detallada que permita identificar todas las enzimas e intermediarios involucrados en cada una de las rutas. (Ludwig & Cohen, 2002)

Las rutas de síntesis del IAA que se conocen hoy en día se basaron en evidencias obtenidas a partir de la identificación de intermediarios, logrando la síntesis de IAA que se puede derivar del triptófano en cuatro vías:

- ❖ Descarboxilación para producir triptamina (TAM)
- ❖ Oxigenación para originar indolacetamida (IAM);
- ❖ Transaminación para producir ácido indol-3-pirúvico (IPA)
- ❖ Oxigenación para producir indol-3-acetaldoxima (IAOx). (Ludwig & Cohen, 2002)

4.9.1.2. Transporte de auxinas

El ápice de los tallos es sin duda el tejido por excelencia donde se sintetiza IAA y de donde se puede establecer un gradiente de la hormona hasta la base. La cantidad de auxina presente en hojas dependerá de la edad de estos tejidos (Rashotte, *et al.*, 2003). Aunque se estima que los niveles de IAA decrecen con la edad foliar, proteólisis en el tejido senescente podría generar un nuevo aumento de la hormona a causa de un aumento del precursor Trp.

Las semillas que están en proceso de crecimiento también representan una fuente significativa de auxinas. En los frutos, la cantidad de IAA tiende a incrementarse después de la polinización (Went & Thimann, 1937).

4.9.1.3. Efectos fisiológicos

- ❖ Crecimiento y formación de raíces
- ❖ Regulación de tropismos
- ❖ Dominancia apical
- ❖ Abscisión de órganos
- ❖ Diferencia vascular

(Jenik & Barton, 2005)

4.9.1.4. Mecanismos de acción

- ❖ Expansión y alargamiento celular
- ❖ Receptores de auxinas
- ❖ Expresión génica

(Hager, 2003)

4.9.2. Giberelinas

(Malonek, *et al.*, 2005) describe que las giberelinas (GAs) son hormonas de crecimiento compuestas por diterpenoides tetracíclicos que participan en diversas etapas de desarrollo en diversas plantas. Aunque se han identificado más de 100 tipos en las plantas, solo unas pocas presentan una función biológica relevante.

El compuesto activo se aisló del hongo *Gibberella fujikoroii* por Eichi Kurosawa en 1926 por lo que se denominó “giberelina”. Creando así un efecto sobre las plantas afectadas provocando un notable incremento de altura, consecuente a esto se presenta una fuerte merma en la producción de grano. El mayor crecimiento se originó por el alto contenido del ataque fúngico (Malonek, *et al.*, 2005).

4.9.2.1. Síntesis, degradación y transporte

La producción de GAs tiene lugar en diversas ubicaciones, de acuerdo con (Hedden & Phillips, 1997), excluyendo la situación específica en las semillas de cereales. En las plántulas, la presencia de concentraciones elevadas de estas hormonas se identifica en hojas, yemas en desarrollo, material maduro en la etapa de fructificación y en menor proporción en las raíces. Es relevante destacar que no todas las partes que participan en la producción de Gas poseen una actividad constante, ya que únicamente algunas fases de la síntesis pueden llevarse a cabo en estos lugares.

La degradación de GAs es causada por acción de varias oxidasas. Cabe destacar que existen interacciones de síntesis y degradación de GAs con otras hormonas, como el AIA (Thomas, *et al.*, 1999).

Diversos compuestos intermedios circulan a través del floema, repartiéndose hacia diferentes órganos de destino donde se finaliza la transformación a moléculas activas. La longitud del fotoperiodo y las condiciones de baja temperatura son factores cruciales en la conservación de intermediarios o giberelinas de formas inactivas a moléculas activas (Sakamoto, *et al.*, 2004).

4.9.2.2. Uso comerciales

- ❖ Transición de fase juvenil a adulta
- ❖ Iniciación floral y determinación del sexo

- ❖ Desarrollo del fruto
- ❖ Partenocarpia
- ❖ Germinación y malteado de cebada
- ❖ Biotecnología

(Yu H., *et al.*, 2004)

4.9.3. Citocininas

Las citocininas desempeñan un papel crucial en diversos procesos relacionados con el crecimiento y desarrollo de las plantas, influyendo en la actividad de múltiples genes. Se pudo observar su impacto hormonal de manera rápida al provocar distintos tipos de morfogénesis en tejidos de tabaco y otras especies cuando se usaron conjuntamente con auxinas en condiciones de cultivo *in vitro* (Skoog & Miller, 1965).

Según su origen se pueden distinguir dos tipos de citocininas: aquellas naturales generadas por las plantas y otras artificiales, sintetizadas por el hombre. La mayoría de las citocininas naturales y artificiales conservan la base adenina, aunque a las segundas se les ha ligado diversas moléculas, generándose así, por ejemplo, la benciladenina (BA) o la furfurilaminopurina (kinetina) (Kakimoto, 2003).

Las citocininas se localizan en ambos sistemas conductores, floema y xilema y su presencia se considera como una posible señal vinculada con un déficit de nutrientes en el suelo. En cuanto a su degradación, las citocininas pueden ser inactivadas por O-glicosilación en el grupo hidroxilo terminal en citocininas tipo zeatina o por N-glicosidación en el N3 o N7 de la adenina. El primer efecto es reversible, considerándose esta forma como de reserva o almacenamiento (Huetteman & Preece, 1993).

4.9.3.1. Usos comerciales

- ❖ Propagación y regeneración de tejidos
- ❖ Control de la senescencia
- ❖ Generación de variedades o genotipos nuevos

(Aoyana & Oka, 2003)

4.10. Otros métodos

4.10.1. Banco de semilla

La preservación a través de la utilización de bancos de semillas se destaca como uno de los enfoques más efectivos para la conservación de orquídeas (Neto & Custodio, 2005), ya que una planta tiene la capacidad de generar múltiples frutos (cápsulas), cada uno conteniendo desde cientos a millones de semillas, de 0.05 a 6.0 mm de longitud y 0.31 a 24 μg de peso (Arditti, 2008). Las orquídeas cuentan con semillas ortodoxas, debido a su longevidad que se llega a mejorar cuando disminuye el contenido de humedad de 20% a 5%, y logrando su almacenamiento en temperaturas de 5 °C a 0 °C. (Pritchard & Seaton, 1993) algunas de estas llegan a mantener 50% de vialidad en un periodo de 8 a 14 años. Siendo comunes los lotes de semillas sin embriones o semillas con vialidad baja; por ello la calidad fisiológica es de suma importancia en especies extrañas o amenazadas.

El uso de tetrazolio es un método donde se pueden obtener porcentajes confiables con respecto a las semillas fiables de una muestra en cuanto a su calidad y vigor. La valoración de la vitalidad de las semillas mediante el uso del tetrazolio se convierte en un proceso de carácter habitual, sencillo, veloz y de inversión económica moderada, que facilita la elección de los lotes aptos para su preservación.

4.10.2. Germinación asimbiótica de semillas

Como ha sido planteado por varios autores la reproducción es algo difícil, porque no todas logran ser de una capsula e incluso fértiles, además de que llegan a depender tanto de su calidad como de su entorno físico para logran un embrión viable (Billard, *et al.*, 2014). (Arditti, 2008) menciona que en muchos casos el tamaño del embrión con respecto a la testa no es relativo, por lo que el volumen de la semilla llega solo a llenarse de aire en un 96% dejando al embrión con escasez de humedad. Otro factor importante llega a demostrarse es sobre la concentración alta de ABA, son los efectos como la reducción de su germinación, llegando a requerir las mismas condiciones ambientales del hospedero y conocer la simbiosis exacta de los hongos micorrícicos, a pesar de ello solo el 1% germina o llega a la etapa adulta. (Romero, *et al.*, 2007), (Verma, *et al.*, 2014)

4.10.3. Conservación *in vitro*

La decisión para optar por la preservación *in vitro* se debe tomar con respecto al tiempo que llegue a necesitar en su almacenamiento. El ejemplo claro es la reducción en el desarrollo de plántulas, en corto o mediano plazo, siendo la criopreservación el único método para lograr un almacenaje largo cumpliendo así el objetivo. (Cerdeira, 2001)

4.10.4. Técnicas de crecimiento mínimo

(Kulus & Zalewska, 2014) habla sobre la conservación a mediano plazo en especies donde es posible al lograr la variación de condiciones ambientales haciendo a un lado el desarrollo, por otra parte, para el medio de cultivo se logra al diluir los minerales que contiene, disminuyendo la concentración de azúcar, al igual de los inhibidores de crecimiento y por último el aumento de compuestos activos osmóticamente.

4.11. Organogénesis directa

El primer proceso ocurre cuando la generación de brotes implica la etapa intermedia de la creación de callos, mientras que la organogénesis directa involucra la propagación desde explantes sin la fase intermedia de callos (George & Debergh, 2008). Esta transformación morfogénica se estimula de manera artificial mediante el uso de reguladores de crecimiento (RC).

La reacción en condiciones de cultivo *in vitro* puede cambiar debido a diversos elementos, entre los que se incluyen: la cantidad interna y la disponibilidad de RC, el estado de desarrollo del explante y la especie que está siendo examinada (Machakova, *et al.*, 2008).

4.12. Organogénesis indirecta

La organogénesis indirecta por ende, provoca la variabilidad somaclonal y da lugar a la manifestación de atributos distintos que no se encuentran presentes consecuentemente induce la variación somaclonal y permite exponer características diferentes que no están presentes de forma regular en la naturaleza o bien sirve para eliminar alguna que no se necesite (Sala & Labra, 2003). La formación de callos demanda un inicio a partir de un explante que exhiba un alto grado de diferenciación en sus tejidos, como fragmentos de raíz, tallo u hoja. Alternativamente, también es posible lograrlo utilizando tejidos menos especializados, como los hipocótilos y cotiledones de plántulas que han germinado recientemente (Correia & Canhoto, 2010).

En cualquier caso, la inducción de callo representa un proceso de diferenciación y división celular intensiva, el cual, (Feeney, *et al.*, 2007) y (Rashmi & Trivedi, 2014). Afirman que esto se debe a un conjunto de factores como: el explante, su genotipo, el medio de cultivo, y el conocimiento de la concentración o combinación de algún regulador de crecimiento.

Por otra parte, los callos pueden ser utilizados para hacer suspensiones celulares para la producción de embriones somáticos. Para ello se requiere de una alta concentración de auxinas en la etapa de inducción de callo (Trabelsi, *et al.*, 2010).

4.13. Embriogénesis somática

La embriogénesis somática en condiciones de cultivo *in vitro* es viable, ya que prácticamente cualquier tipo de tejido vegetal somático puede transformarse en un embrión (por su totipotencia) mediante el ajuste de las condiciones de cultivo y la incorporación de reguladores del crecimiento. La primera evidencia de que las plantas podían generar embriones somáticos en un entorno de laboratorio se registró en 1958 (Reinert, 1958) y (Steward, *et al.*, 1958). Este concepto está firmemente confirmado en más de 200 especies de relevancia agronómica. Los embriones somáticos pueden generarse a partir de células vegetativas, tejidos reproductivos, embriones cigóticos o callos originados en cualquiera de las secciones de las plantas (Copeland & McDonald, 1995).

Refiriéndose únicamente a la teoría, es el más eficiente para una gran masa de producción en plantas *in vitro* debido a la naturaleza bipolar del embrión, dando lugar a la automatización del proceso productivo, una alta multiplicación en cortos períodos de tiempo, aplicando importancia a los principios de la cinética microbiana y la posibilidad de encapsular estas estructuras, logrando la obtención de semillas artificiales. Las desventajas de esto se enfocan en el desconocimiento de los parámetros que puedan regular el proceso, mostrando un número limitado de especies como resultado de una embriogénesis somática eficiente (Yeung, *et al.*, 1996).

4.14. Desinfección

La desinfección engloba la acción de eliminar microorganismos infecciosos mediante la aplicación de sustancias químicas o procedimientos físicos. Los compuestos antimicrobianos conocidos como desinfectantes pueden ocasionalmente emplearse intercambiamente como esterilizadores agentes de limpieza o antisépticos. Entre los empleados en la atención

de la salud animal, se encuentran compuestos químicos antimicrobianos o biocidas de considerada potencia y, por lo general, toxicidad, destinados a ser aplicados exclusivamente en áreas afectadas por contaminación, por otra parte, los que se usan en la industria agroalimentaria son generalmente menos tóxicos y también menos concentrados. Principalmente conformados por compuestos químicos, jabones, detergentes y elementos que promueven la penetración de los ingredientes activos, los desinfectantes contemporáneos presentan su estructura. (Block, 1991)

El cultivo de tejidos en su acepción es definido como un conjunto heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas, ya sea para su preservación o multiplicación. (Levitus, *et.al.*, 2010)

4.14.1. Posibilidad de contaminación con microorganismos

Es de gran importancia cultivar explantes de plantas donantes que crecen en condiciones de invernadero, logrando una disminución de las tasas de contaminación. Por otra parte, es recomendable no hacer uso de explantes que no se encuentren asépticos (raíces, rizomas) por ejemplo, plantas que su crecimiento fue en el exterior o en el campo, dado que en la mayoría de los casos los procesos de desinfección no obtienen buenos resultados. (Levitus, *et.al.*, 2010)

4.14.2. Desinfectantes

Un procedimiento que es muy utilizado consiste en una doble desinfección mediante la inmersión de los explantes en etanol (70%v/v) durante 20-60 segundos, seguido de hipoclorito de sodio 1-3%, contenido en el agua de lavandina comercial, durante 3 a 30 minutos, dependiendo de la naturaleza del explante, teniendo en cuenta que no es una recomendación directa por otra parte (Levitus, *et.al.*, 2010) comenta que algunos procedimientos se basan en el empleo de únicamente etanol o de hipoclorito de sodio. Consecuente a esto es importante que al final siempre es necesario eliminar los restos de estos productos mediante varios lavados con agua estéril.

Dentro de las sustancias utilizadas en la desinfección del material vegetal se encuentran el hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio (CaClO), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), etanol (C₂5OH) y bicloruro de mercurio (HgCl₂), donde el hipoclorito de sodio ha

sido el compuesto más frecuentemente usado por varios investigadores con buenos resultados para la desinfección y el establecimiento in vitro del material vegetal, a concentraciones y tiempos diferentes. Este producto es efectivo, económico y de fácil adquisición. (De la Cruz, *et.al.*, 1998; Medero *et.al.*, 1999)

4.15. Trabajos de Propagación in vitro

Salazar, *et.al.*, (2013) menciona que las técnicas de cultivo in vitro resultan indispensables para mejorar la eficacia germinativa, el crecimiento y desarrollo de orquídeas con fines comerciales e investigativos. El medio de cultivo más eficiente para la germinación de híbridos de *Phalaenopsis* a las 18 semanas de cultivo fue el Murashige & Skoog (MS) suplementado con agua de coco, y jugo de piña con diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$: Tukey HSD), con respecto a los demás medios de cultivo, contribuyendo de esta manera al uso de componentes orgánicos con el fin de mejorar la germinación y desarrollo de *Phalaenopsis*.

Moreno, (2011) comenta que la propagación vegetativa convencional se enfrenta a la tasa de multiplicación lenta, y no provee suficientes clones dentro de un corto tiempo y la propagación in vitro de orquídeas como una opción para la propagación rápida de cultivares comercialmente valiosos ha progresado bien durante las últimas décadas.

De Feria, (2007) aporta que, en relación con la desinfección de las semillas botánicas, el mejor tratamiento resultó ser 1.5% de Hipoclorito de sodio y 20 minutos con 12.5% de contaminación microbiana. La germinación de las semillas botánicas se inició como promedio a los 23 días de cultivo y los primeros cuerpos protocórmicos fueron observados a las seis semanas de cultivo.

V. Materiales y métodos

5.1. Recolección del material

Para el material vegetal se adquirieron plantas en floración, del mercado de flores, ubicado en Tenango de las flores, que es una localidad ubicada en el municipio de Huachinango, ubicado al norte del estado de Puebla, se utilizaron como material de partida, para las diferentes fases del cultivo *in vitro*.

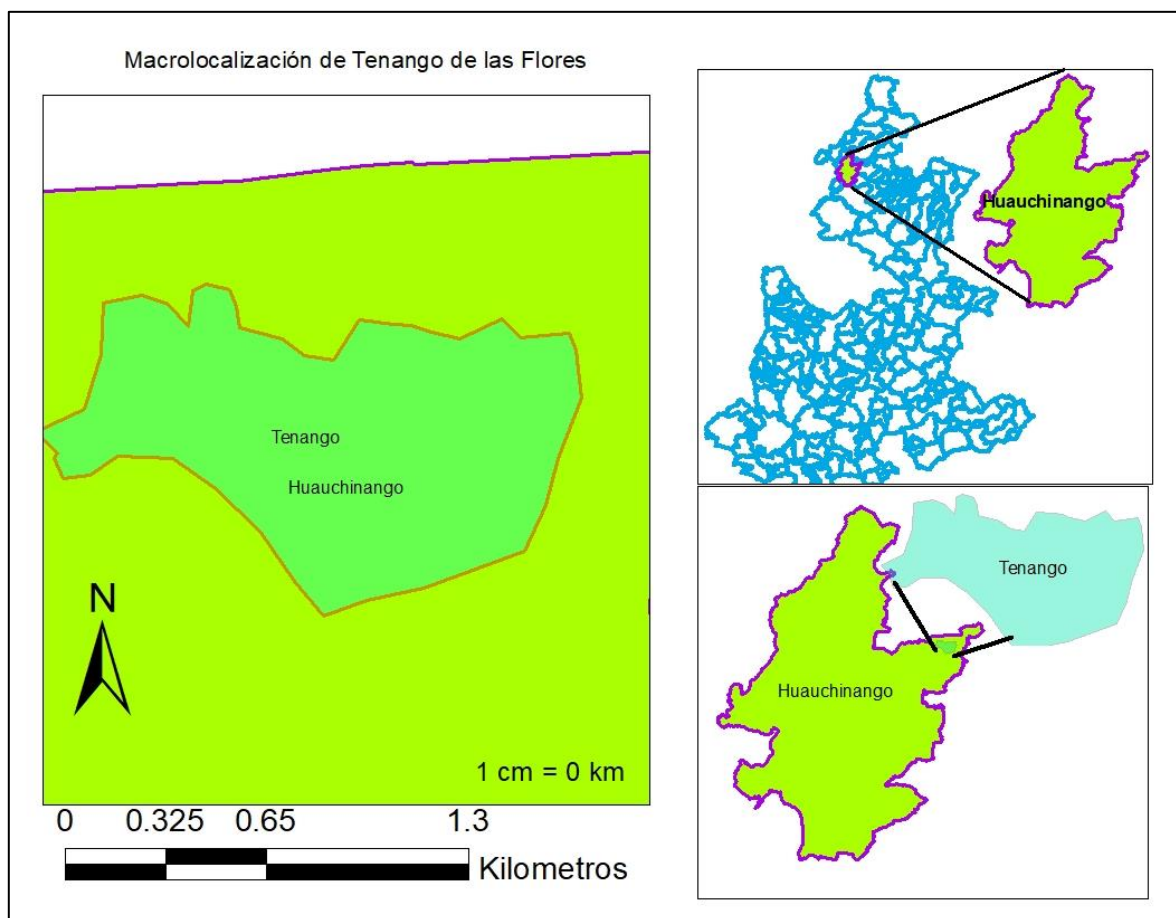


Figura 1. Macrolocalización de Tenango de las Flores

5.2. Manejo de plantas madre

La aclimatación y manejo de las plantas madre, se llevó a cabo dentro de la Facultad de Ingeniería Agrohidráulica, que se encuentra ubicada en la Junta Auxiliar de San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla. A una altitud de 1675 msnm, delimitado por las coordenadas con $19^{\circ}58'31''$ de latitud norte y $97^{\circ}22'02''$ de longitud oeste. (INEGI, 2015).

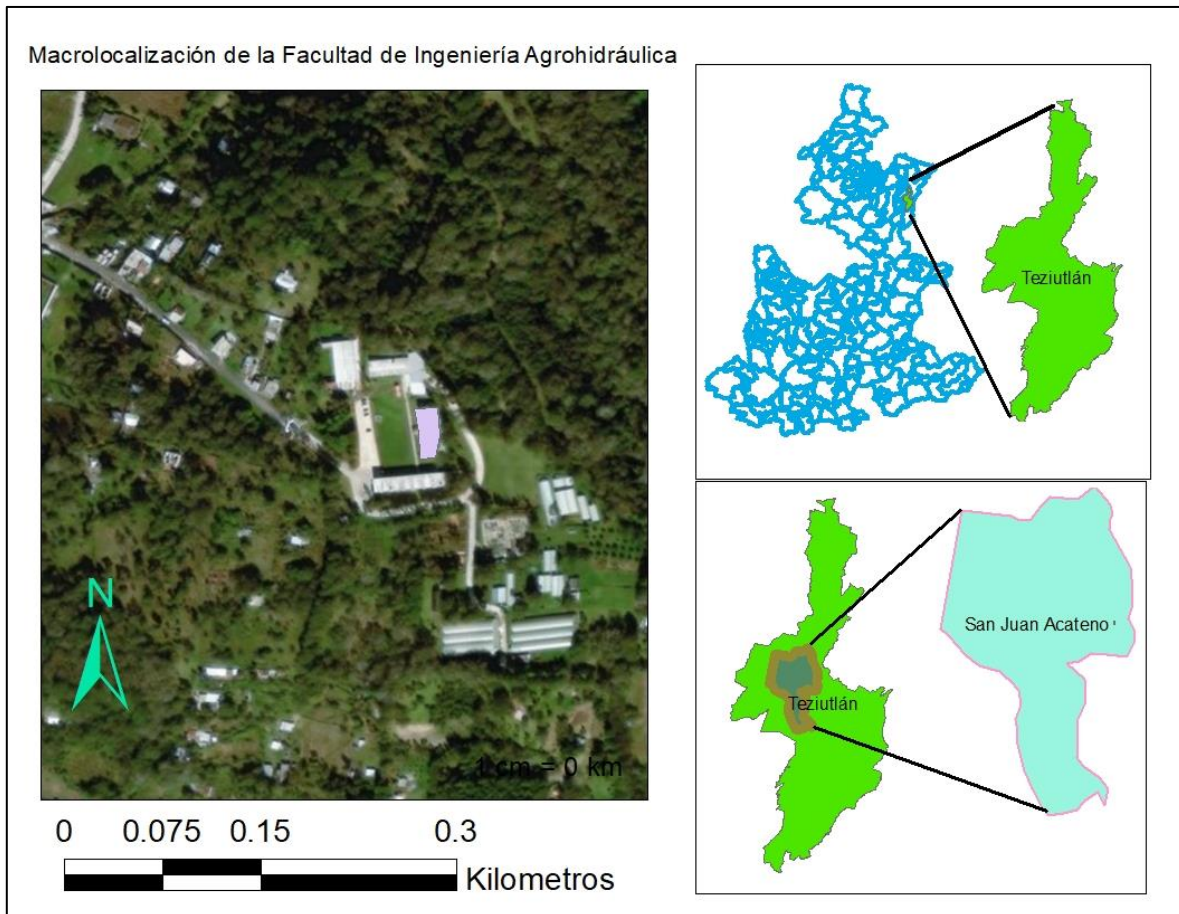


Figura 2. Macrolocalización de la Facultad de Ingeniería Agrohidráulica

5.3. Manejo del laboratorio

5.3.1. Acondicionamiento y esterilización

Antes de hacer uso del laboratorio de Cultivo de tejidos vegetales (CTV) se realizó una limpieza para asegurar que el lugar no contara con patógenos que afectaran a la siembra de los explantes, en este caso como agente desinfectante se usó hipoclorito de sodio al 10%.

Todo el material de laboratorio se lavó con detergente comercial, agua de la llave y se aplicó un enjuague final con agua desionizada.

Los materiales que se usaron fueron frascos con capacidad de 250 mL y tubos de ensayo, el instrumental quirúrgico (bisturí y pinzas de disección) y cajas Petri, los cuales se esterilizaron en una autoclave tipo vertical (marca AESA mod. CV 250) con un tiempo de 30 minutos a una presión de $1.2 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Las operaciones de siembra de los explantes en los medios de cultivo se realizaron en una cabina de flujo laminar horizontal. La asepsia del instrumental utilizado dentro de la cabina se realizó mediante inmersión en etanol 70% (v/v) y flameo con mechero de alcohol.

5.3.2. Cuarto de incubación

Los cultivos *in vitro* se desarrollaron en un cuarto de incubación, mediante un ambiente controlado de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad (luz artificial), con una temperatura que oscilo entre 25±2 °C.

5.4. Descripción de tratamientos

5.4.1.1. Colecta de explantes

Se colectaron como explantes secciones de hoja de las plantas (*Orchidaceae* var. *Phalaenopsis zuma pixie*, *Orchidaceae* var. *Phalaenopsis amabilis* y *Orchidaceae* var. *Phalaenopsis rhynchonopsis*) en condiciones de invernadero, para su extracción se utilizó una navaja desinfectada con alcohol al 70%, se utilizaron aquellas hojas que no presentaban daños ni presencia visual de plagas y enfermedades.

5.4.1.2. Lavado y Desinfección

El lavado de los explantes se realizó con detergente biodegradable durante 10 minutos y se enjuagaron con agua corriente. Posteriormente se les dio una desinfección previa con alcohol al 70 %, durante 1 minuto, para después realizar un enjuague con agua estéril. Para la desinfección final se utilizó bicloruro de mercurio en concentraciones del 0.2 %, 0.25 % y 0.3 % durante 10 minutos y enjuague con agua estéril. Este último paso se realizó en una campana de flujo laminar.

5.4.1.3. Siembra de explantes

La siembra se realizó dentro de la campana de flujo laminar con ayuda de pinzas y bisturí, se realizaron cortes de aproximadamente de 1 cm² y fueron colocados en tubos de ensaye con 15 mL de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), el cual estuvo suplementado con Myo-inositol 100 mg·L⁻¹, Tiamina 1.0 mg·L⁻¹, picloram 0.0, 1.0 y 2 mg·L⁻¹, Piridoxina 1 mg·L⁻¹, Sacarosa 30 gr·L⁻¹, solidificado con 2.8 gr·L⁻¹ de agar (Sigma ®), ANA 0.074 y 0.148 mg·L⁻¹. Previamente esterilizado en autoclave durante 20 minutos a una presión de 1.2 kg/cm².

5.5. Diseño experimental

5.5.1. Primera fase: Desinfección

El diseño experimental que se utilizó fue completamente al azar con 3 tratamientos y 6 repeticiones. La unidad experimental consistió en 6 tubos de ensaye con un explante de hoja cada uno. Los factores que se evaluaron fueron tres concentraciones de bicloruro de mercurio (HgCl_2): 0.2(%), 0.25 (%) y 0.3(%).

5.5.2. Segunda fase: Efecto del medio y desinfección en el establecimiento

Para esta fase se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial con 6 tratamientos y 3 repeticiones. Los factores que se evaluaron, fueron como factor "A": dos dosis diferentes de bicloruro de mercurio (HgCl_2): 0.25 (%) y 0.3 (%) y como factor "B": tres diferentes dosis de Picloram: $0.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

5.6. Variables a evaluar: primera fase

Las variables se evaluaron 10 días después de iniciados los tratamientos de desinfección:

- ❖ Contaminación
- ❖ Supervivencia
- ❖ Fenolización de explante (baja, media y alta)
- ❖ Porcentaje de Pérdida

5.7. Variables a evaluar: segunda fase

Para observar el efecto de los reguladores de crecimiento en el establecimiento *in vitro* se evaluaron las siguientes variables 20 días después de iniciados los tratamientos.

- ❖ Contaminación
- ❖ Supervivencia
- ❖ Fenolización de explante baja, media y alta (Evaluación visual)
- ❖ Porcentaje de Pérdida

5.5. Análisis estadístico

Las variables evaluadas fueron analizadas mediante un análisis de varianza (ANOVA) y las pruebas de comparaciones múltiples de medias de Tukey ($P \leq 0.05$), con el paquete estadístico SAS versión 9.2.

VI. Resultados y discusión

6.1. Primera fase: Desinfección

El establecimiento *in vitro* presenta complicaciones con el tema relacionado a la contaminación microbiana, la cual puede ser por hongos y bacterias; siendo de gran importancia un buen programa de desinfección para estas mismas, que inclusive afectan a la oxidación y fenolización del medio o del explante. En el Cuadro 1, se muestran los resultados obtenidos del análisis de varianza en el efecto de los tratamientos bajo las concentraciones de bicloruro de mercurio (HgCl_2), en el medio de cultivo (MS), usando explantes de hoja. Encontrando diferencias significativas estadísticas con ($P \leq 0.05$) en las variables de contaminación por hongo y contaminación por bacteria, por otra parte, se encontró una diferencia altamente significativa con ($P \leq 0.01$) en el porcentaje de pérdida de explante, en cuanto a las variables supervivencia, baja fenolización y media fenolización, no se encontraron diferencias estadísticas significativas. Respecto a la relación de los factores evaluados, se encontró una influencia positiva en los diferentes parámetros de fenolización. Se podría mencionar que las concentraciones de bicloruro de mercurio, fueron las indicadas para la desinfección.

Cuadro 1. Análisis de varianza para las variables evaluadas bajo las condiciones de bicloruro de mercurio (HgCl_2).

F.V.	G.	H	B	S	BF	MF	AF	PP
	L.							
HgCl₂	2	0.038*	0.027 *	0.007 ns	0.119 ns	0.113 ns	0.0014 ns	0.004 **
Error	15							
Total	17							

F.V.: Fuente de variación; **G.L.:** Grados de libertad; **H:** Contaminación por hongo; **B:** Contaminación por bacteria **S:** Supervivencia de explantes; **BF:** Baja Fenolización en el explante; **MF:** Media Fenolización en el explante; **AF:** Alta Fenolización en el explante; **PP:** Porcentaje de pérdida de explantes; ****:** Altamente significativo con $P \leq 0.01$; *****: Significativo con $P \leq 0.05$ y **ns:** no significativo.

El Cuadro 2 muestra la comparación de medias de las variables evaluadas, se encontró que las concentraciones de bicloruro tienen un efecto significativo sobre la fenolización del explante, ya que al utilizar bajas concentraciones de bicloruro de mercurio (0.2 %) los explantes mostraron una baja fenolización (94.4 %), sin embargo, aunque no mostraron diferencias significativas en la contaminación por hongos, hubo una mayor presencia de estos patógenos en la concentración más baja, con una incidencia del (47.5 %) problemas de fenolización en la baja concentración de (5.56 %) mostrando una ausencia de alta fenolización en este. Por otro lado, el tratamiento 3 (0.3 %) logro controlar la incidencia de agentes contaminantes como hongos (11%) y bacterias (13.1%), tuvo un efecto significativo al aumentar los niveles de oxidación de los explantes, presentando en el (69.4 %) de estos una fenolización media, aunque no significo la muerte de los explantes, si detuvo el desarrollo de los mismos. Aunque no se encontraron diferencias significativas en las variables supervivencia y pérdida de los explantes, numéricamente el tratamiento 2 (0.25 %) fue el que presentó un mayor éxito en el establecimiento de explantes de hoja con un (62.8 %) seguido del tratamiento 3 con un (55.5%), y por consiguiente en la variable pérdida tuvieron un efecto correspondiente con un (37.1%) y (47.2 %), respectivamente.

Cuadro 2. Comparación de medias para las variables bajo las concentraciones de bicloruro de mercurio (HgCl₂)

Tratamiento (%)	H (%)	B (%)	S (%)	BF (%)	MF (%)	AF (%)	Pp (%)
1 0.2	47.5 a	0.0 a	47.23 a	94.43 a	5.56 b	0.0 a	52.7 a
2 0.25	26.3 a	30.85 a	62.83 a	52.76 ab	47.23 ab	0.0 a	34.16 a
3 0.3	11.0 a	13.16 a	55.58 a	25.0 b	69.43 a	5.56 _a	47.2 a
Cv	9.66	8.76	12.97	9.04	10.13	2.37	13.47

Medias con la misma letra no tienen diferencia significativa; Variables: H (%): Porcentaje de contaminación por hongo, B (%): Porcentaje de contaminación por bacteria, S (%): Supervivencia de explantes, BF (%): Porcentaje de baja fenolización en el explante, MF (%): Porcentaje de media fenolización en el explante, AF (%): Porcentaje de alta fenolización en el explante, Pp (%): Porcentaje de pérdida de explantes.

El uso de bicloruro de mercurio en concentraciones entre 0.2 y 0.3 % presentó una incidencia de hongos como agentes contaminantes entre el 11 y 47 %, respectivamente resultados que coinciden parcialmente con los encontrados por:

Beltrán y Mesa (2014), ya que al emplear una concentración de 0.2 % de HgCl₂ durante 20 min., lograron una incidencia de hongos en el cultivo *in vitro* de comino (*Aniba perutilis Hemsley*) del 8 %, Por otro lado, García *et al.*, (2015) encontraron que una doble desinfección con HgCl₂ del 0.3 % durante 10 minutos, seguida de la eliminación de primordios florales de palo rosa (*Aspidospermia polyneuron*) y una segunda desinfección con una concentración de 0.1 % durante 1 min lograron un amplio control de contaminación y bajos índices de oxidación.

Clavijo *et al.*, 2016, concluye que la falta de uniformidad en la respuesta del explante al medio se debe a varios factores como diferencias genéticas, uso de diferentes desinfectantes, diferencias genéticas, competencia de nutrientes y microclimas en el recipiente de cultivo. Valdez (2019), desarrollo un protocolo de desinfección utilizando bicloruro de mercurio en la propagación *in vitro* de maguey (*Agave salmiana*) obteniendo un 31% de supervivencia y con 10 min de agitación y un 71 % de baja fenolización. Concluyendo que la desinfección es posible con este agente desinfectante con una concentración de 0.25 %.

Los procesos de oxidación en el explante son causados principalmente por efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, los cortes que sufre, la composición del medio de cultivo, volumen y calidad del frasco. George, (1993), Van Staden *et al.*, (2006), Abdelwahd *et al.*, (2008) y Tabiyeh *et al.*, (2016).

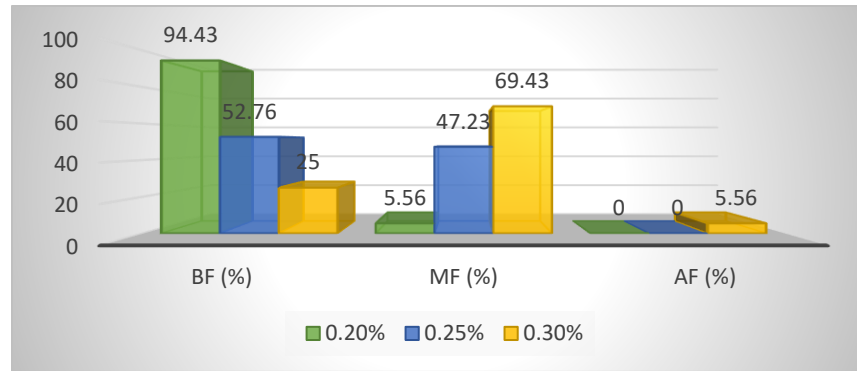


Figura 3. Niveles de fenolización (baja, media, alta) en explantes de hoja de Phalaenopsis desinfectados con tres concentraciones de bicloruro.

En la Figura 4, se muestra la oscilación que existe entre la pérdida y la supervivencia de explantes, donde la pérdida se debió principalmente a la contaminación de explantes, Mendoza (2016), menciona que la supervivencia de 70 % en el establecimiento *in vitro* de la orquídea Tripita (*Tricholipilia tortilis* Lindl) se debió a la cuidadosa desinfección superficial de la cápsula con cualquier desinfectante de amplio espectro, como jabón neutro, hipoclorito de sodio y del instrumental utilizado en toda la etapa de establecimiento y puede llegar a un 70 %. Sánchez (2009) al usar fibra de coco y promix en la evaluación de medios de cultivo para la reproducción *in vitro* de *Laelia anceps*, menciona que para la supervivencia del 65 % presento que el uso de compuestos orgánicos ayudó, mientras que el restante de contaminación se debió al alto nivel de humedad.

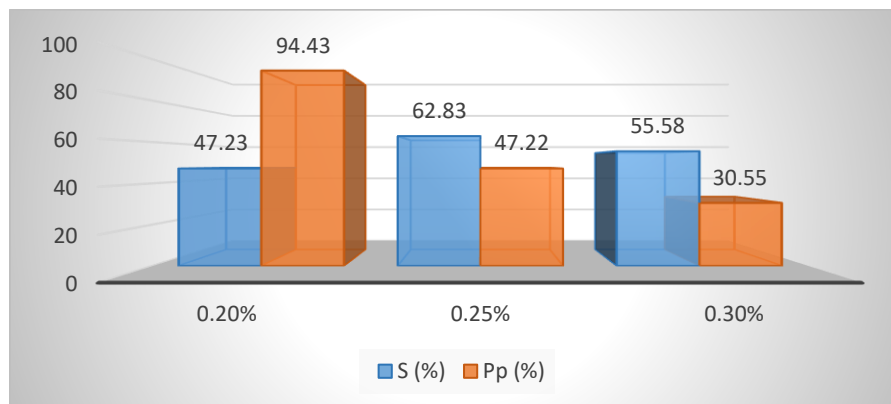


Figura 4. Relación de porcentaje de supervivencia de explantes y porcentaje de pérdida de explantes, empleando tres concentraciones de HgCl₂ como agente desinfectante.

Pérez y Castañeda (2016), mencionan un proceso distinto de desinfección en su trabajo sobre la propagación *in vitro* de orquídeas nativas como una contribución para conservación *ex situ*, utilizando una solución jabonosa concentrada (2 %) durante cinco minutos, aplicando tres enjuagues con agua microfiltrada estéril y limpiando la superficie de trabajo con un algodón estéril humedecido con hipoclorito de sodio al 13 %, realizando al final una aspersion con alcohol al 70 % y flamear, logrando así un índice de menor contaminación, favoreciendo así a la germinación de las especies (*E. chioneum*, *O. pyramidale*, *C. revolutum* y *E. nocturum*)

Tirado *et. al.*, (2005), mencionan que para la multiplicación masiva de protocormos de *Phalaenopsis* mediante el sistema de inmersión temporal “RITA” involucra una serie de factores que, son claves para obtener éxito en su propagación, sin embargo, se debe tomar en cuenta mucho la porosidad del material para evitar la vitrificación y fenolización de los tejidos.

Cornejo (2016), en su investigación sobre el efecto de dos reguladores en la propagación *in vitro* de *Phalaenopsis* concluye que con el uso de reguladores se obtienen resultados positivos para la propagación, superando el 70% de la cantidad de brotes generados.

6.2. Segunda fase: Efecto del medio y desinfección en el establecimiento

Con la finalidad de evaluar el efecto del medio en el establecimiento *in vitro* de *Phalaenopsis*, se evaluó el efecto del regulador de crecimiento picloram y el efecto de bicloruro de mercurio. En el Cuadro 3, se muestra el análisis de varianza para el efecto de las concentraciones de bicloruro de mercurio (HgCl_2) y picloram, como agente de desinfección y regulador crecimiento sobre los explantes. De los factores estudiados, para la concentración de bicloruro de mercurio no se encontraron diferencias significativas en las variables de estudio, mientras que para el factor picloram solo se presentaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) para las variables de contaminación por bacterias y alta fenolización. Por otro lado, la interacción de ambos factores presentó diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en los diferentes niveles de fenolización.

Cuadro 3. Análisis de varianza para las variables respuesta a las concentraciones de bicloruro de mercurio (HgCl_2) y Picloram.

F.V.	G.L.	H	B	S	BF	MF	AF	PP
HgCl ₂	1	0.007 ns	0.0005 ns	0.00004 ns	0.0601**	0.0445 ns	0.0014 ns	0.001 ns
Picloram	2	0.001 ns	0.0871*	0.0478 ns	0.0180 ns	0.0158 ns	0.0014 *	0.054 ns
HgCl ₂ * Picloram	2	0.011 ns	0.0058 ns	0.0157 ns	0.0913 *	0.1011 *	0.0014 *	0.013 ns
Error	12							
Total	17							

F.V.: Fuente de variación; G.L.: Grados de libertad; H: Contaminación por hongo; B: Contaminación por bacteria S: Supervivencia de explantes; BF: Baja Fenolización en el explante; MF: Media Fenolización en el explante; AF: Alta Fenolización en el explante; PP: Porcentaje de pérdida de explantes; **: Altamente significativo con $P \leq 0.01$; *: Significativo con $P \leq 0.05$ y ns: no significativo.

En el Cuadro 4 se muestran los resultados obtenidos bajo el efecto de la combinación de concentraciones de bicloruro de mercurio (HgCl_2) con diferentes concentraciones de picloram en la desinfección y establecimiento *in vitro* de explantes de orquídea *Phalaenopsis*. De acuerdo a lo estudiado se puede observar que, aunque no se encontraron diferencias significativas en la contaminación por hongos, numéricamente una concentración de 0.3% de bicloruro evita el desarrollo de patógenos. En el caso de la contaminación por bacterias hubo un efecto similar, ya que ambas concentraciones (0.25 % y 0.3 %), redujeron su presencia al 16 % y 0 %, respectivamente. Sin embargo, este efecto se vio afectado por la presencia de picloram en el medio en una concentración de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ya que esta concentración aumento la presencia de bacterias en un 53 %.

En cuanto a los niveles de fenolización se encontraron diferencias significativas siendo la concentración de 0.25 % de bicloruro, la que presentó un mayor porcentaje e explantes con baja fenolización (88.86 %) al combinarse con $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de picloram. Al aumentar la concentración de bicloruro al 0.3 %, hubo una mayor oxidación de los explantes obteniendo un 100% de explantes con media fenolización en presencia de picloram, aunque no significó la muerte de los explantes, si llegó a deteriorar su desarrollo. En cuanto a las variables de supervivencia y pérdida de explantes, no se encontraron diferencias estadísticas, pero numéricamente los tratamientos 3 (0.25 % + $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y 4 (0.3 % + $0.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), son los que presentaron una mayor supervivencia de los explantes con el 94 y 83 % respectivamente. Por el contrario, los tratamientos 5 y 6 (66 % y 49 %), respectivamente. La pérdida de explantes fue debido principalmente a la presencia de bacterias como agentes contaminantes.

Cuadro 4. Comparación de medias en todos los tratamientos con las variables evaluadas

Tratamientos	H (%)	B (%)	S (%)	BF (%)	MF (%)	AF (%)	PP (%)
1 0.25 % HgCl_2 + $0.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Pic	27.73 a	16.33 ab	55.6 a	27.76 ab	72.23 ab	0.0 b	44.4 a

	0.25 %							
2	HgCl ₂ + 1.0 mg·L ⁻¹ Pic	10.6 a	55.33 a	50.03 a	77.77 ab	22.23 ab	0.0 b	49.9 a
	0.25 %							
3	HgCl ₂ + 2.0 mg·L ⁻¹ Pic	5.53 a	0.00 b	94.47 a	88.86 a	11.13 b	0.0 b	5.5 a
	0.30 %							
4	HgCl ₂ + 0.0 mg·L ⁻¹ Pic	0.0 a	0.0 b	83.37 a	55.5 ab	33.36 ab	11.13 a	22.24 a
	0.30 %							
5	HgCl ₂ + 1.0 mg·L ⁻¹ Pic	0.00 a	53.33 a	33.40 a	55.53 ab	44.46 ab	0.0 b	66.65 a
	0.30 %							
6	HgCl ₂ + 2.0 mg·L ⁻¹ Pic	16.67 a	10.00 ab	77.8 a	0.0 b	100 a	0.0 b	22.2 a
C.V.		8.1	7	11.06	10.17	10.43	1.87	12.43

Medias con la misma letra no tienen diferencia significativa; HgCL₂: Biclورو de mercurio; Pic: Picloram; Variables: H (%): Porcentaje de contaminación por hongo, B (%): Porcentaje de contaminación por bacteria, S (%): Supervivencia de explantes, BF (%): Porcentaje de baja fenolización en el explante, MF (%): Porcentaje de media fenolización en el explante, AF (%): Porcentaje de alta fenolización en el explante, Pp (%): Porcentaje de pérdida de explantes.

En el Cuadro 5 se puede observar que las altas concentraciones de bicloruro de mercurio (HgCL₂) tienen un buen espectro en cuanto al control de la contaminación en explantes de orquídea, siendo la concentración 0.03 mg·L⁻¹ la que tiene un menor porcentaje en contaminación por hongos y bacterias, mostrando un mayor porcentaje de supervivencia, sin afectar la fenolización de explantes manteniéndola en baja.

Cuadro 5. Comparación de medias para la variable respuesta en concentraciones de HgCL₂.

Concentración HgCL ₂	H (%)	B (%)	S (%)	BF (%)	MF (%)	AF (%)	PP (%)
------------------------------------	-------	-------	-------	--------	--------	--------	--------

1	0.25 mg·L ⁻¹	12.93	20.37	66.7	100	0.0	0.0	64.80
		a	b	a	a	a	a	a
2	0.3 mg·L ⁻¹	7.40	27.74	64.85	100	0.0	0.0	35.17
		a	a	a	a	a	a	a
C.V		59.62	0	9.21	0	0	0	87.39

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes. HgCL₂: bicloruro de mercurio; C.V.: Coeficiente de variación; H (%): Porcentaje de contaminación por hongo; B(%): Porcentaje de contaminación por bacteria; S: Porcentaje de supervivencia de explante; BF: Porcentaje de baja fenolización en el explante; MF: Porcentaje de media fenolización en el explante; AF: Porcentaje de alta fenolización en el explante; PP: Porcentaje de pérdida en el explante.

Beltrán D. y Mesa N. (2014) concluyen en su trabajo de investigación que el bicloruro de mercurio a una concentración de 0.25% por 20 minutos de inmersión arrojó la mayor efectividad en el control de la contaminación de hongos y bacterias endógenas y en la reducción de los efectos colaterales sobre los explantes de yemas de *A. perutilis* Hemsley.

Serrano, (2016) comparte en su investigación sobre *Bletia purpurea* var. *Purpurea*, que el establecimiento aséptico de los explantes se logra al procesarlas con un tratamiento a base de Tween® 20 al 1% durante 10 min, Benlate® + Captan® (8 g L⁻¹ c/u) durante 30 min, H₂O₂ al 3% durante 1 h y NaOCl al 15% + plata coloidal 10% durante 15 min, obteniendo un porcentaje de contaminación solo del 4 % con una amplia supervivencia, mencionando que se debió a un claro seguimiento de un buen control sanitario.

Méndez (2014), concluye que el cloruro de mercurio es un desinfectante recomendado especialmente en aquellos casos en que los explantes tienen alto grado de contaminación, por ejemplo, en el establecimiento *in vitro* de *Terminalia amazonia* ayudo a reducir de igual manera la oxidación en hojas y ápices.

Rojas (2014), los resultados en su investigación confirman es posible la propagación *in vitro* de la orquídea *Phalaenopsis violácea* a través de la vara floral con un 90 % de supervivencia, mostrando diferencias significativas entre los diferentes tratamientos y que estos influyen de

manera positiva en el crecimiento de las plántulas, ayudando en el desarrollo de las hojas y raíces.

En la figura 5 se puede observar como el porcentaje de supervivencia se mantuvo a la ventaja del porcentaje de pérdida, asimilando que los porcentajes de bicloruro de mercurio (HgCl_2), controlaron mejor la incidencia de contaminantes.

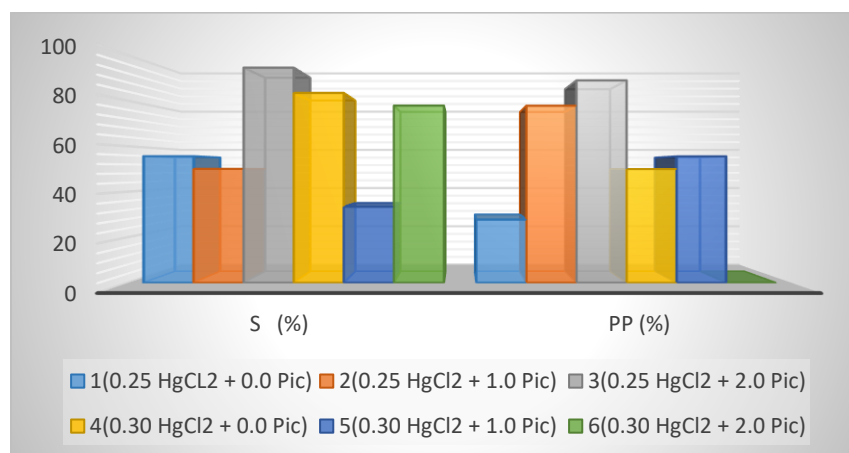


Figura 5. Relación del porcentaje de supervivencia y el porcentaje de pérdida en explantes, empleando tres concentraciones de HgCl_2 adicionado con picloram.

Santiago *et. al.*, (2020) mencionan en su investigación sobre bacterias simbióticas asociadas a *Prostehechea citrina*, una orquídea endémica de México, que la presencia de microorganismos durante un cultivo *in vitro* de tejidos vegetales ocurre debido a las características anatómicas propias de la especie, tales como la presencia de tricomas en las hojas y tallos, que impiden la penetración de los desinfectantes.

Frausto *et. al.*, (2019) estudiaron cuatro formulaciones de sales minerales (MS al 100 %, MS al 50 %, Kudson y Fertilizante NPL 18-9-18/15-30-15) en su investigación en orquídea (*Phalaenopsis*), concluyendo que el uso de reguladores en los medios son la mejor opción para mantener la viabilidad de las yemas florales.

VII. Conclusión

La presente investigación tuvo como primordial objetivo establecer un protocolo de desinfección en el establecimiento *in vitro*, así como determinar la mejor concentración de bicloruro en cuanto a su potencial de desinfección en base a la fenolización causada en los explantes.

Se concluye que:

- ❖ EL uso de bicloruro como desinfectante es una alternativa para el establecimiento *in vitro* de la especie y acondicionarlo a especies similares.
- ❖ La adición de Picloram en el medio MS en concentraciones altas presenta complicaciones en la contaminación.
- ❖ Es necesario continuar investigando el desarrollo de los explantes para generar nuevos temas de investigación.
- ❖ Esta investigación puede funcionar como referencia para trabajos similares en la desinfección y establecimiento de otros cultivos.

VIII. Bibliografía

- Abdelwahd, R., Hakam N., Labhilili M., UduPa S., 2008. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* planted regeneration of *faba* vicia. *African journal of biotechnology* 7:997-1002.
- Aguirre, G; Pierre, J; Leigue, L. 2016. Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos filogenéticos. Bolivia.
- Aoyana & Oka. (2003). Cytokinin signal transduction in plant cells. . *J Plant Research*, 221-231.
- Arditti, J., Ball, E., Resigner, D., (1975). Culture of flower-stalk buds: a method for vegetative propagation of *Phalaenopsis*. *Orquídea (México)* 5 (8): 249-255
- Arditti, J., Ernest, R., (1992). *Micropropagation of Orchids*. John Wiley and Sons. New York. 681 p.
- Arditti. (2008). Micropropagation of orchids. *Agro Productividad*, 31-36.
- Astorga B.p., Chacón F. M., Latsague V.M., Rodriguez B.M., (2014). *Inducción in vitro de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en Ugni molinae*. Temuco, Chile: Facultad de Recursos Naturales.
- Bahadur M. R., Bahadur R. B., Timsina B., Münzbergová Z., (2013). An annotated checklist of the orchids of Nepal Nordic. *Journal of Botany*, págs. 31: 511–550.
- Barros F. de, Vinhos, F., Rodrigues, V.T., Barberena, F.F.V.A., Fraga, C.N., Pessoa, E.M., Forster, W., Menini Neto, L., Furtado, S.G., Nardy, C., Azebedo, C.O., Guimaraes, L.R.S., (2016). *Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Beltrán P.D., Mesa L.N. (2014). El dicloruro de mercurio como desinfectante en la micropropagación del comino (*Aniba perutilis Hemsley*). *Revista Colombiana*. Colombia.

- Billard C.E., Dalzotto C.A., Lallana V.H., (2014). Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *Oncidium*. *Polibotánica*, 145-157.
- Budiharta S., Didik Widyatmoko, I rawati, Harry Wiriadinata Rugayah, Tukirin P artomihardjo, I smail, Tahan Uj i, Ary Prihardhyanto Keim and Kerrie A. Wilson, (2011). *The processes that threaten Indonesian plants fauna & flora International*. Indonesia: Oryx.
- Cerda, C. F. (2001). *Embriogénesis somática directa a partir de explantes foliares de plántulas cultivadas in vitro de Coffea arabica L.* Mérida, Yucatán: Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
- Chase, M.W., Freudenstein, J.V., Cameron, K.M. y Barret, R.L., (2003). *DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification*. Kota Kinabalu, Sabah: Natural History Publications.
- Clavijo, A.G., Pico, D.C. y Rojas, L.G., 2016. Establecimiento *in vitro* de protocormos de *Prosthechea* sp. bajo diferentes concentraciones de ácido naftalenacético
- Copeland & McDonald . (1995). *Principles of Seed Science and Technology*. New York: Chapman & Hall.
- Correia & Canhoto. (2010). *Characterization of somatic embryoattached structures in Feijoa sellowiana Berg.* Protoplasma.
- Cortez. (2013). *Manual P´ractico de Producción y Manejo de Orquídeas Phalaenopsis*. El salvador, Centro América: ENA.
- Cornejo, (2016). Efecto de la combinación de Thidiazuron y Bencilaminopurina sobra la propagación *in vitro* de dos híbridos de *Phalaenopsis* sp. (Orchidaceae). Facultad de Ciencias Agroalimentarias. Costa Rica.
- Cribb P.J., Kell S.P., Dixon K.W., Barret R.L., (2003). *Orchid conservation: a global perspective*. Orchid conservation.

De la Cruz, G., Borges, M., Aguilera, N., Saborit, G., Labrada, M. 1998. Multiplicación acelerada del ñame (*Dioscorea alata* L.) en condiciones *in vitro*. Resúmenes. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, La Habana, Cuba, p. 8.

De Fera. (2007). Establecimiento *in vitro* de *Phalaenopsis*. *Biotecnología Vegetal Vol. 7 No. 1*, 1-7.

Delporte C., Backhouse N., Inostroza V., Aguirre M., Peredo N., Silva X., (2007). Analgesic activity of *Ugni molinae* (murtilla) in mice models of acute pain. *Journal of Ethnopharmacology*, págs. 162-165.

Dressler. (2005). *How many orchis specied?* Selbyana.

Dressler, R. (1993). *Phylogeny and Classification of the Orchid Family*. Portland, Oregon: Dioscorides Press.

Engelmann y González. (2013). Introducción a la conservación *in situ* de los recursos genéticos vegetales. *Crioseervación de Plantas en América Latina y el Caribe.*, 107-117.

Fay. (1994). In what situations is *in vitro* culture appropriate to plan conservation? *Biodiversity and Conservation.*, 176-183.

Feeney M., Bhagwat B., Mitchell J., Lane W., (2007). *Shoot regeneration from organogenic callus of sweet cherry (Prunus avium L.)*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture.

Fhan. (1982). *Anatomía Vegetal*. Madrid: Ediciones Pirámide.

Frausto, K.A.J., Ojeda, M.C.Z., Alvarado, O.G.G., García, E.A.Z., Rodríguez, F.H., Rodríguez, P.G., (2019). Inducción de brotes a partir de varas florales de la orquídea *Phalaenopsis spp.* (Blume) *in vitro*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. Volumen 10:6.

From M.M., Gouveia T., Rajaonarivelo J.F., Friedman S., Logeman D., Ravoniarison N., (2005). *Conserving Orchids in the Eastern Rain Forest of Madagascar: An Integrated Approach to Linking Local Residents and Biotechnology*. Selbyana.

- García L.D., Mesa N.L., Ocampo G.M., 2015. Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de *Aspidosperma polyneuron*. *Revista Colombiana Biotecnológica*. Colombia.
- George, E.F., 1993. *Plant propagation by tissue culture Part 1: The Technology*. 2ed. England. Exegetics Ltda. 574 p.
- George & Debergh. (2008). *Micropropagation: Uses and Methods. Plant propagation by tissue culture*, 29-64.
- Godínez. (2004). Propagación in vitro dos orquídeas de interés comercial, mediante el cultivo en suspensión. *XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*, 1.
- Guevara y Jiménez. (1996). Propagación in vitro de *Phalaenopsis* (Orchidaceae) mediante el cultivo de secciones de ejes florales después de la senescencia de las flores. *Agronomía Costarricense* 20, 1-5.
- Hager. (2003). Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *Journal of Plant Research*, págs. 483–505.
- Hágsater y Soto . (1998). *Orchid conservation in Mexico*. Selbyana.
- Hágsater E., Soto Arenas M.A., Salazar Chávez G.A., Jiménez Machorro R., López Rosas M.A., Dressler R.L., (2005). *Las orquídeas de México*. México, D.F.: Instituto Chinoin, A.C.,.
- Halbinger y Soto. (1997). *Laelias of México, Herbario AMO, Orquídeas*. México, D.F.: Arenas.
- Hedden & Phillips. (1997). Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation, *Annu. Plant Physiol.*, 431–460.
- Hernández Jares, Y. 2013. Establecimiento y multiplicación in vitro de *Citrus aurantifolia* Christm. Swing. var. Mexicana a partir de semillas. México.
- Huang, H. (2011). Plant diversity and conservation in China: planning a strategic bioresource for a sustainable future. *Botanical Journal of the Linnean Society*, págs. 282-300.

- Huetteman & Preece. (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 105-119.
- Iñiguez, J. C. (2017). Importancia y aprovechamiento sustentable de productos forestales no maderables en bosques de niebla: estudio de caso en Orquídeas. *AGRO PRODUCTIVIDAD*, 3-11.
- Irawati. (2013). Conservation of orchids the gems of the tropics. *Agro Productividad*, 31 - 36.
- Iriondo. (2011). *Conservación de Germoplasma de especies raras y amenazas*. Madrid, España: Universidad Politécnica de Madrid.
- Islam S.S., Islam T., Bhattacharjee B., Mondal T.K., Subramaniam S., (2015). In vitro pseudobulb based micropropagation for mass development of *Cymbidium finlaysonianum*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, págs. 469-474.
- Jenik & Barton. (2005). Surge and destroy: the role of auxin in plant embryogenesis. *Development*, 3577-3585.
- Jordán y Casarreto. (2006). *Auxinas, Giberelinas y Citocininas*. Santiago, Chile: Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias Biológicas.
- Kakimoto. (2003). Biosynthesis of cytokinins. *J Plant Research*, 233-239.
- Kulus & Zalewska. (2014). Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species. *Sciential Horticulture*, 88-107.
- Larson G.C., Gómez C., Sánchez O.M., Ríos D., (2006). *Inducción de callogénesis indirecta en Eucalyptus globulus*. Bosque.
- Larzon, R. A. (2004). *Introducción a la Foricultura*. Carolina del Norte: AGT EDITOR, S.A.
- Lee. (2008). *Rescate y multiplicación de las orquídeas Laelia anceps ssp. dawsonii y Vanilla planifolia Andrews por métodos biotecnológicos*. . Estado de México: Facultad de Ciencias.
- Levitus G., Echenique V., Rubistein C., Hopp E., Mroginski L., (2010), *Biotecnología y mejoramiento vegetal*, Argentina, ArgenBio,

- Ludwig & Cohen. (2002). Identification and quantification of three active auxins in different tissues of *Tropaeolum majus*. *Physiologia Plantarum*, 320–329.
- Machakova I., Zazimalova E., George E.F., (2008). Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. *Plant Propagation by Tissue Culture*, 175-204.
- Malonek S., Bomke C., Bornberg-Bauer E., Rojas M.C., Hedden P., Hopkins P., Tudzynski B., (2005). Distribution of gibberellin biosynthetic genes and gibberellin production in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Phytochemistry*, 1296-1311.
- Mijail, R. (2011). *Floricultura: Cultivo y Comercialización*. Bogotá, Colombia: Starbook Editorial.
- Mitchell. (1989). Growing hardy orchids from seeds at Kew. *Plantsman. Vol. II. Part 3*, 152-169.
- Medero, V., Del sol, L., García, M., López, J., Ventura, C., Rodríguez, S. 1999. Metodología para la micropropagación del ñame (*Dioscorea alata* L.). Resúmenes BIOCAT-99, Granma, Cuba, p. 12.
- Mendez, A.D., Abdelnour, E.A., (2014). Establecimiento *in vitro* de *Terminalia amazonia*. Revista Forestal Mesoamericana. Costa Rica.
- Moreno. (2011). *Morfogénesis in vitro y transformación transitoria de Phalaenopsis zuma's pixie*. Mérida, Yucatán: Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- Myers M., Mittermeier C.G., da Fonseca G.A.B., Kent J., (2000). *Biodiversity hotspots for conservation priorities*. Nature.
- Nájjar, A. (2011). *BBC Mundo, Ciudad de México*. . Obtenido de BBC Mundo, Ciudad de México. :
http://www.bbc.com/mundo/noticias/2011/10/111006_orquidea_mexico_extincion_an.shtml#page-to
- Nanakorn & Indharamusika . (1999). *Pure Appl. Chem*. Obtenido de Pure Appl. Chem.:
<http://www.iupac.org/symposia/proceedings/phuket97/nanakorn.html>

- Neto & Custodio. (2005). A medium for non-commercial sowing of orchid seed. *Selbyana*, 31-36.
- Orejuela, G. (2012). Orchids of the cloud forests of southwestern Colombia and opportunities for their conservation. *European Journal of Environmental Sciences.*, págs. 2(1): 19-32.
- Pritchard & Seaton. (1993). Orchid seed storage: historical perspective, current status, and future prospects for long-term conservation. *Agro Productividad*, 89-104.
- Perez, B.A.M. y Castañeda, S.L.G., (2016). Propagación *in vitro* de orquídeas nativas como una contribución para la conservación *ex situ*. *Biotecnología Vetel* Vol. 16. Bogotá
- Ramírez, L.G., (2010). Tolerancia a salinidad de *Persea americana* Mill en cultivo *in vitro*. Colegio de Postgraduados. Edo. de México.
- Rashmi & Trivedi. (2014). *Effect of Various Growth Hormone Concentration and Combination on Callus Induction, Nature of Callus and Callogenic Response of Nerium odorum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.
- Rashotte A.M., Poupart J., Waddell C.S., Muday G.K., (2003). Transport of the two natural auxins, indole-3-butyric acid and indole-3-acetic acid, in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 761–772.
- Reinert. (1958). *Untersuchungen uber die morphogenese in gewebeulturen*. Ver. Dtsch. Bot. Ges. .
- Rojas, D.R., 2014. Propagación *in vitro* de la orquídea *Phalaenopsis violacea* a través de la vara floral. Universidad de Guayaquil. Ecuador.
- Romero T.R., Rosales L.B.S., Barba A.A., (2007). Uso de complejos comerciales como sustitutos de componentes del medio de cultivo en la propagación *in vitro* de *Laelia anceps*. *Agro Productividad*, 353-356.
- Sakamoto T., Miura K., Itoh H., Tatsumi T., Ueguchi -Tanaka M., Ishiyama K., Kobayashi M., Agrawal G.K., Takeda S., Abe K., Miyao A., Hirochika H., Kitano H., Ashikari

- M., Matsuoka M., (2004). An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol*, 1642–1653.
- Sala & Labra. (2003). *Somaclonal variation*. In Thomas B, DJ Murphy, B Murray eds. *Encyclopedia Appl. Plant Sci. Oxford*. Reino Unido: Academic Press Elsevier.
- Salazar S., Amaya A., Barrientos F., (2013). Evaluación de diferentes medios de cultivo *in vitro* en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XV No.2*, 1-9.
- Sánchez, M.R., 2009. Evaluación de medios de cultivo para la reproducción *in vitro* de *Laelia anceps*. Colegio de Postgraduados. Edo. De México.
- Santiago, G.T., Lozoya, S.H., y Rodríguez, M.M.L., (2020). Symbiotic bacteria associated to *Prosrhechea citrina*, a Mexican endemic orchid. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(3): 398-407.
- Scully R.M. (1996). Stem propagation on *Phalaenopsis*. *Orchid Soc. Bull.* 35(1). 40-42
- Serna. (1999). *Propagación in vitro de orquídeas a partir de semilla sexual*. Manizales, Colombia: Universidad de Caldas, A.A. .
- Serrano F.E., 2016. Morfogénesis *in vitro* de *Bletia purpurea* var. *purpurea* (Lam.) DC. Colegio de Postgraduados. Edo de México.
- Siregar, C. (2008). Exploration and Inventory of Native Orchid Germplasm in West Borneo. *HortScience*, 43(2), 554-557.
- Skoog & Miller. (1965). *Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro*. New York: Molecular and Cellular Aspects of Development.
- Soto-Arenas M.A., Hágater E., Jiménez R., Salazar G.A., Solano R., Flores R., Ruiz I., (2007). *Las Orquídeas del México*. México, D.F.: Instituto Chinoín.
- Stefanello S., Vesco D.L.L., Pierre H., Ducroquet J., Nodari R.O., Guerra M.P., (2005). *Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (Feijoa sellowiana Berg)*. *Scientia Horticulturae*.

- Steward F., Mapes M., Mears K., (1958). Growth and organized development of cultured cells. *American Journal of Botany*, págs. 705-708.
- Subedi A., Kunwar B., Choi Y., Dai Y., Van Andel T., Chaudhary R.P., de Boer H.J. Gravendeel B., (2013). Collection and trade of wild-harvested orchids in Nepal. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, págs. 9 (64): 1-10.
- Sudhakaran S., Teixeira da Silva J.A., Sreeramanan S., (2006). *Test tube bouquets - in vitro flowering*. Isleworth, UK: Global Science Books, Ltd.
- Swarts & Dixon . (2009). *Perspectives on orchid conservation in botanic gardens*. Trends in Plant Science.
- Tabiyed D., Bernard F. Stacker H., (2006). Investigation of glutathione, salicylic acid and GA, effects on brown ing in *pistacia vera* shoot tips culture. *Acta Horticulturae* 726:201-204
- Tanaka, M., Sakanishi, Y., (1997). Clonal propagation of *Phalaenopsis* by leaf tissue culture. *Am. Orchid Soc Bull.* 46: 733-737.
- Thammasiri, K. (2008). *Acta Hortic. Cryopreservation of some Thai orchid species.* , (págs. 53-62).
- Thomas S.G., Al Phillips., Hedden P., (1999). *Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation.* . U.S.A: Proc. Natl. Acad.Sci.
- Tirado, J.M., Julia, E.N., Atehortúa, L., (2005). Propagación *in vitro* de *Phalaenopsis (Orchidaceae)* a partir de protocormos, mediante el sistema de inmersión temporal RITA. *Revista Colombiana de Biotecnología* Vol. VII. Bogotá.
- Tisserat B., Esan E., Murashige T., (1979). Somatic embryogenesis in angiosperms. *Hort. Rev.*, 1-78.
- Trabelsi E., Naija S., Elloumi N., Belfeleh Z., Msellem M., Ghezal R., Bouzid S., (2010). Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of olive *Olea europaea* (L.) 'Chetoui'. (págs. 319-324.). *Acta Physiologiae Plantarum*.

- Valdez, I.M., 2019. Establecimiento *in vitro* de Maguey (*Agave salmiana* G.) por vía organogénesis directa e indirecta. Facultad de Ingeniería Agrohidráulica. Edo. de Puebla.
- Van Staden J., Fennell C., Taylor N. 2006. Plant stress in vitro: the role of phytohormones. *Acta horticultrae* 725:55-62
- Vaz A.P.A., Rita de Cássia L., Kerbauy G.B., (2004). Photoperiod and temperature effects on *in vitro* growth and flowering of *P. pusilla* an epiphytic orchid. *Plant Physiology and Biochemistry*, 411-415.
- Verma J., Sharma K., Thakur K., Sembi J.K., Vij S.P., (2014). Study on seed morphometry of some threatened Western Himalayan orchids. *Turkish Journal of Botany*, 234-251.
- Went & Thimann. (1937). *Phytohormones*. New York: The Macmillan Company.
- Withner, C. (1959). The Orchids. En C. Withner, *The Orchids* (págs. 1-648). New York: Ronald Press.
- Yam T.W., Chua J., Tay F., Ang P., (2010). Conservation of the native orchids through seedling culture and reintroduction-a Singapore experience. *Bot. Rev.*, 76:263–274.
- Yeung E., Rahman H y Thorpe T., (1996). Comparative Development of zygotic and microspore-derived embryos in *Brassica napus* L. cv Topas. I. Histodifferentiation *Int. J. Plant Sci.*, 27-39.
- Yu H., Ito T., Zhao Y., Peng J., Kumar P., Meyerowitz E.M., (2004). *Floral homeotic genes are targets of gibberellin signaling in flower development*. U.S.A: Proc Natl Acad Sc.