



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE ALGUNOS PARAMETROS FISIOLÓGICOS DE
PLÁNTULAS GERMINADAS *IN VITRO* DE *Laelia speciosa*
(Orchidaceae) EN DIFERENTES SISTEMAS DE VENTILACIÓN**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA, PRESENTA:**

NOEMY VARGAS QUIJANO

DIRECTORA: DRA. ANA LAURA LÓPEZ ESCAMILLA

MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO. 2010



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA
COORDINACIÓN DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE CONTROL ESCOLAR, UAEH

PRESENTE

Por este conducto le comunico que el Jurado asignado a la pasante de Licenciatura en Biología **Noemy Vargas Quijano**, quien presenta el trabajo recepcional de tesis intitulado "Evaluación de algunos parámetros fisiológicos de plantas germinadas *in vitro* de *Laelia speciosa* (Orchidiaceae) en diferentes sistemas de ventilación", después de revisarlo en reunión de sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE: Quim. Blanca Estela Pérez Escandón

PRIMER VOCAL: Dra. Leticia Romero Bautista

SEGUNDO VOCAL: M. en C. Manuel González Ledesma

TERCER VOCAL: Dra. Ana Laura López Escamilla

SECRETARIO: Dr. Miguel Ángel Villavicencio Nieto

PRIMER SUPLENTE: Dra. Maritza López Herrera

SEGUNDO SUPLENTE: Dra. Claudia Teresa Hornung Leoni

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi más atenta consideración.

ATENTAMENTE
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"
Mineral de la Reforma, Hidalgo a 08 de diciembre de 2010

Biol. Ulises Iturbe Acosta
Coordinador Adjunto de la Licenciatura en Biología



LA PRESENTE INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE MORFOFISIOLOGÍA VEGETAL DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE HIDALGO, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. ANA LAURA LÓPEZ ESCAMILLA.

AGRADECIMIENTO

- ❖ A la Dra. Ana Laura López Escamilla, por sus enseñanzas y asesoría, por su comprensión y paciencia para concluir esta tesis... UN MILLÓN DE GRACIAS... gracias por apoyarme de forma incondicional en esta segunda oportunidad. Mi admiración y respeto para usted.
- ❖ A los Directivos del Centro de Investigaciones Biológicas de la UAEH por luchar para contar con los laboratorios que nos permiten desarrollarnos profesionalmente.
- ❖ A los sinodales Dra. Maritza López Herrera, Dra. Leticia Romero Bautista, Dra. Claudia Hornung Leoni, Dr. Miguel Ángel Villavicencio Nieto, Quim. Blanca Estela Pérez Escandón, M. en C. Manuel González Ledezma y al Biól. Ulises Iturbe Acosta, MIL GRACIAS POR SIN INVALUABLE APOYO, SIN USTEDES ÉSTE SUEÑO NO SE HUBIESE HECHO REALIDAD.
- ❖ Al Programa del Mejoramiento al Profesorado (PROMEP) por la beca otorgada durante la realización del proyecto “Estrategias de conservación para las Laelias (Orchidaceae) de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo”.
- ❖ Al M. en C. Mario Segura Almaráz del Centro de Investigaciones Biológicas-UAEH por la realización de la secuencia fotográfica de la frecuencia estomática y por su constante motivación.
- ❖ A todos y a cada uno de mis profesores por dedicar parte de su tiempo y esfuerzo en mi formación profesional. MIL GRACIAS.
- ❖ A mis compañeros del Laboratorio de Morfofisiología Vegetal en el periodo de experimentación, en especial a Dulce por su apoyo, motivación y amistad.
- ❖ A mis compañeras (os) y amigas (os) del Consejo Estatal de Ecología por sus consejos y motivaciones para no darme por vencida.
- ❖ A mis amigas, Elvia, Claus, Bianca, Mari, Sra. Yolis, gracias por sus consejos y motivación para nunca darnos por vencidas.
- ❖ Y finalmente, Rubi gracias por ayudarme, Rosa muchas gracias por dedicar parte de tu tiempo y en especial a ti Alfo, mil gracias por tu infinito apoyo en los últimos días de este proyecto.

MIL GRACIAS.

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen de Guadalupe, porque gracias a la Fe que les tengo he logrado salir adelante en la mayoría de los retos que se presentan en mi vida, porque a pesar de todos los obstáculos y de las difíciles decisiones que he tenido que tomar, siempre me han bendecido para lograr mis objetivos.

A mis padres por darme la oportunidad de vivir...

A ti papá porque me has demostrado que a pesar de las pruebas que nos pone el destino nunca hay que detenerse, siempre hay que mirar con fe, con esperanza y aferrarse a la vida....

A ti mamá porque con tu ejemplo de trabajo, lucha, dedicación y esfuerzo aprendí que nunca hay que darse por vencida... aquí esta cumplido uno de mis mas grandes sueños y se los dedicó con todo mi amor.

A mi hermana y a mi hermano, porque ustedes llegaron a mi vida para formar una gran familia, con sus defectos pero con grandes virtudes, gracias por ser mis dos grandes motivos de superación, porque cada uno con sus ejemplos me ha enseñado a vivir. Rubi, Alfo... LOS QUIERO MUCHO.

En especial a ti Albert, mi regalo de la vida, por representar gran parte de mi felicidad, te dedico este trabajo por todo el amor que me has dado, por tu comprensión y paciencia a pesar del tiempo y la distancia; y sobre todo porque a tu lado he aprendido que en esta vida todo es posible y que los sueños se hacen realidad. Gracias por estar siempre a mi lado y por impulsarme a ser cada día mejor... nunca desmayé en lo que emprendí, a pesar de los trabajos mas duros y de los peores sacrificios. TE AMO.

A mi abue, porque sé que desde el cielo me sigue cuidando como cuando era niña... por todos los lindos recuerdos, siempre vivirás en mi corazón.

Y finalmente, a un ser que me esta enseñando a sentir lo inexplicable, me siento feliz de que haya llegado a mi vida y Dios quiera sea para siempre... por el resto de mi vida.

CONTENIDO	Pág.
ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
1. Las orquídeas.....	4
a) Características.....	6
b) Distribución.....	8
c) Orquídeas mexicanas.....	8
d) Situación y problemática.....	9
2. Estrategias de conservación.....	12
3. Cultivo de tejidos vegetales.....	13
a) Ventajas y desventajas.....	16
4. Características de las plantas cultivadas <i>in vitro</i>	18
a) Hiperhidratación.....	18
b) Estomas.....	19
c) Estrés hídrico.....	21
5. Aclimatización.....	23
A) Modificaciones morfológicas y fisiológicas de las plantas durante la aclimatización.....	24
a) Densidad estomática.....	26
b) Contenido de clorofila.....	26
c) Control de la pérdida del agua.....	27
B) Técnicas de aclimatización.....	28
6. Micropropagación de orquídeas.....	34
7. <i>Laelia speciosa</i>	39
III. JUSTIFICACIÓN.....	43

IV. OBJETIVOS	
1. Objetivo General.....	44
2. Objetivos específicos.....	44
V. MATERIAL Y MÉTODOS	
1. Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>L. speciosa</i>	44
2. Establecimiento de los sistemas de ventilación.....	45
3. Evaluaciones fisiológicas.....	47
a) Cuantificación de clorofila.....	47
b) Frecuencia estomática	48
Metodología general.....	50
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
1. Germinación <i>in vitro</i> de semillas <i>L. speciosa</i>	51
2. Evaluación de los sistemas de ventilación.....	51
a) Pérdida de peso	51
b) Pérdida de peso con plántulas de <i>Laelia speciosa</i>	54
3. Evaluaciones fisiológicas.....	55
a) Cuantificación de clorofila.....	55
b) Características de los estomas.....	61
c) Frecuencia estomática.....	63
VII. CONCLUSIONES.....	64
BIBLIOGRAFÍA.....	66
ANEXO 1.....	71

ABREVIATURAS:

ANA	Ácido naftalén acético
BA	6-Benciladenina ó 6-Bencilaminopurina
CITES	Convention on Internacional Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (por sus siglas en inglés). Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
KC	Medio Knudson C (1946)
MS	Medio Murashige y Skoog, 1962
PBL'S	Cuerpos parecidos a protocormos
PBZ	Paclobutrazol
SEMARNAT	Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales
TDZ	Tidiazuron, N-fenil-N'-1,2,3-tridiazolil-5-urea

RESUMEN

Se cultivaron *in vitro* plántulas de *Laelia speciosa*, orquídea endémica del centro de México y considerada en peligro de extinción por la sobreexplotación que presenta debido a sus características ornamentales y artesanales, se distribuye principalmente en la Sierra Madre Oriental y Occidental, el Eje Volcánico Transversal y en las montañas adyacentes de la Altiplanicie Central.

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales son una alternativa de conservación, ya que a partir de poco material, es posible obtener un número elevado de individuos que pueden ser comercializados sin afectar a las poblaciones silvestres. Sin embargo, las plantas obtenidas con estas técnicas, por lo regular presentan problemas de sobrevivencia ocasionados por el fenómeno de hiperhidratación. Por lo tanto y con la finalidad de mejorar las condiciones fisiológicas de las plantas, se ha implementado la etapa de aclimatización dentro del cultivo de tejidos.

En el presente trabajo se establecieron 5 sistemas de ventilación con frascos de vidrio, medio de cultivo Knudson C, cubiertos con tapas de polipropileno perforadas en el centro y cubiertos por ambos lados con aislantes en diversas formas. Se evaluó el peso de los cultivos como medida de la deshidratación, se determinó la frecuencia estomática y la cantidad de clorofila presente en las plántulas aclimatizadas en los diferentes sistemas de ventilación.

De acuerdo a los resultados se concluye que el sistema E no es favorable ya que se deshidrata muy rápido y no favorece significativamente la presencia de clorofila, sugiriendo trabajar con el sistema C ya que presento diferencias estadísticamente significativas en cuanto al incremento de clorofila y permite un buen desarrollo de estomas.

I. INTRODUCCIÓN

Desde que inició la historia de la Tierra han existido un sin fin de organismos sobre el planeta, que en el transcurso de los miles de millones de años, se han ido extinguiendo. Las razones son diferentes, entre ellas están la escasez de alimento, la depredación, la contaminación y en general cambios climáticos y ambientales a los que no se adaptaron; sin dejar a un lado, que una de las principales causas es la aparición de la humanidad y el aprovechamiento no sustentable de los recursos naturales, lo que ha llevado a una sobreexplotación altamente significativa de la biodiversidad, resultando por lo tanto en la desaparición o extinción de especies. Desafortunadamente las consecuencias se ven hasta que aquello que era útil ya no existe, es por ello que el hombre ha ido buscando alternativas para un aprovechamiento sustentable de los recursos, así como técnicas para evitar la extinción de especies (Ávila y Oyama, 2002; Aguirre-León, 2005; Flores-Escobar *et al.*, 2008)

Una técnica utilizada en la biotecnología es el cultivo de tejidos vegetales como una alternativa eficaz para la propagación masiva de plantas a partir de un solo individuo o un fragmento de las mismas, en un periodo de tiempo menor que el requerido en la naturaleza o por métodos convencionales (Rubluo, 1990; Pérez-Molphe *et al.*, 1999). Ésta técnica se basa en la totipotencialidad celular y se refiere principalmente a la inducción de la regeneración adventicia (a partir de meristemos) o *de novo* (a partir de callo o cultivo de células) de cualquier estructura de la planta para formar eventualmente plantas completas (Razdan, 2003). El término de cultivo *in vitro* cubre

un amplio rango de técnicas en condiciones asépticas incluyendo la germinación de semillas, la micropropagación, cultivo de meristemos y cultivo de callos. Así mismo, el cultivo *in vitro* se usa en un gran número de jardines botánicos para la propagación y conservación de especies vegetales en peligro de extinción (Vovides *et al.*, 1997; Sarasan *et al.*, 2006). Este tipo de cultivo puede tener más ventajas que las técnicas de propagación convencional en algunas especies, como la rápida multiplicación bajo condiciones controladas y libres de patógenos (Fay, 1994), producción masiva de plantas genéticamente estables y el aumento de las tasas de germinación y crecimiento; sin embargo, también existen algunas desventajas como la reducción de la variabilidad genética por la alta producción de clones y los altos costos de infraestructura (Collin y Edwards, 1988; Rojas y Vázquez, 2000).

La micropropagación es la propagación asexual de las plantas utilizando las técnicas del cultivo de tejidos y es una de las técnicas más utilizadas en la biotecnología por su alta productividad en comparación con las técnicas tradicionales de propagación (Debergh y Read, 1991), pero también existen importantes desventajas como la contaminación microbiana del medio de cultivo causado por técnicas asépticas deficientes (Collin y Edwards, 1988), así como el fenómeno de hiperhidratación conocido también como vitrificación generado por la presencia de altos niveles de humedad dentro del recipiente de cultivo que impiden el crecimiento y la formación de hojas y una elevada presión osmótica del medio que lleva a un desarrollo

suculento resultando en tejidos gruesos y traslucidos, cutículas delgadas y pocas raíces (Collin y Edwards, 1988).

Es por ello que una etapa importante dentro de la micropropagación es la aclimatización, en la que se van modificando gradualmente algunas condiciones *in vitro* con el fin de que las plantas se vean obligadas a cambiar su condición mixotrófica por una condición autotrófica para que se hagan más resistentes al cambio de ambiente (Pospisilová *et al.*, 1999) y así aumentar las tasas de sobrevivencia al ser transferidas a un medio *ex vitro*; una estrategia sugerida para aclimatizar las plántulas producidas *in vitro* es el empleo de contenedores ventilados que favorezcan el movimiento del agua a través de la planta (Santamaría *et al.*, 2000).

En esta investigación se utilizó como modelo *Laelia speciosa* (Orchidaceae) para evaluar el efecto de diferentes sistemas de ventilación en un tipo de contenedor en el desarrollo de las plántulas germinadas *in vitro* y analizar algunos parámetros fisiológicos, tales como la densidad estomática y el contenido de clorofila.

II. ANTECEDENTES

1. Las orquídeas:

Las orquídeas son un grupo de plantas muy notables debido a su gran diversidad, se estima que pueden existir entre 20,000 y 30,000 especies, lo que probablemente ha dado como resultado una larga evolución del linaje desde que la primera orquídea apareció en la Tierra, hace unos 100 o 110 millones de años. Han logrado adaptarse a diversas condiciones ambientales, un factor que hace posible que estas plantas sobrevivan a las limitaciones de agua y nutrientes es la asociación que existe entre las orquídeas y los hongos, ya sea durante su germinación o durante toda su vida, este mutualismo le ayuda a la orquídea a obtener nutrientes y compuestos de carbono. Las orquídeas por lo tanto se caracterizan por su amplia complejidad al interactuar con otros seres vivos, ya sean hongos, polinizadores, árboles hospederos u hormigas mutualistas (Hágsater *et al.*, 2005).

Estudios recientes han demostrado que las orquídeas forman un grupo natural, es decir, que incluye todos los descendientes de un ancestro común (Camerón *et al.*, 1999; citado por Hágsater *et al.*, 2005). Hoy día se sabe que forman parte de un grupo mayor, el orden Asparagales. Se reconocen cinco linajes principales dentro de las orquídeas, consideradas de manera formal como subfamilias (Chase *et al.*, 1999; citado por Hágsater *et al.*, 2005). De acuerdo con su orden de aparición en el árbol evolutivo de la familia, estas son: Apostasioides, Vanilloides, Cyprapedioides, Orquidoides y Epidendroides, como se muestra en el diagrama 1:

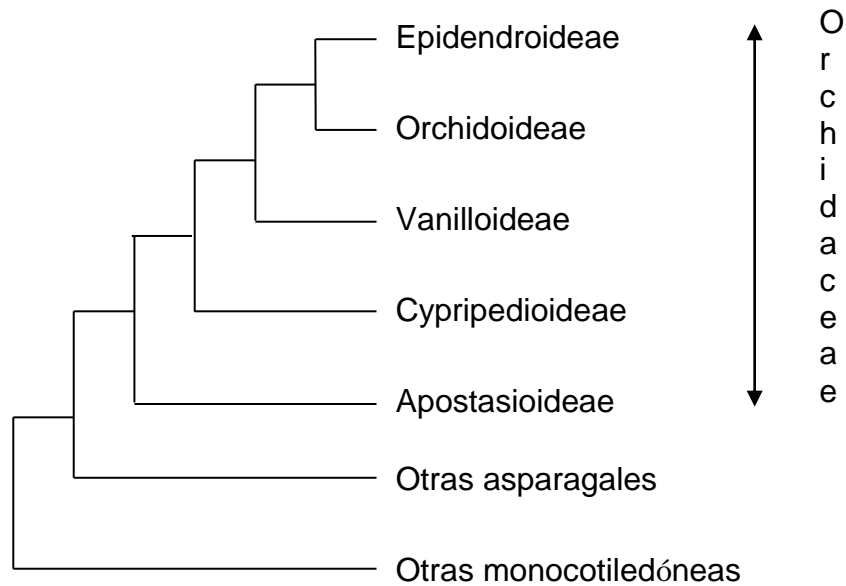


Diagrama 1. Árbol filogenético de la familia de las orquídeas que muestra las relaciones entre las distintas familias (basado en Chase *et al.* 1999, citado por Hágsater *et al.*, 2005).

Es relevante mencionar que las orquídeas, no sólo son importantes por su belleza ya que además representan un grupo ecológico muy importante, por otro lado Darwin percibió que gran parte de las diversas adaptaciones florales de las orquídeas pueden tornar el proceso de polinización más eficiente en muchos aspectos; al mismo tiempo, notó que algunas adaptaciones florales tienen como función atraer y direccionar el comportamiento de los polinizadores en las flores y aumentar las posibilidades de polinización cruzada; en otras palabras, las orquídeas como grupo taxonómico son óptimas para estudiar evolución (Singer, 2009).

a) Características:

Las orquídeas corresponden a la familia *Orchidaceae*, su forma de vida es diversa, hay epífitas, terrestres y rupícolas o litófitas ya que se han adaptado a vivir en ambientes tropicales y subtropicales que se extienden a ambos lados del Ecuador, y sólo un número reducido de ellas se encuentran en zonas templadas o frías. Una gran mayoría vive sobre los árboles (epífitas), sus lugares predilectos para recibir la luz, el calor y el aire húmedo tropical; otras prefieren las rocas semicubiertas de musgo (rupícolas), y otras más son terrestres, es decir las que prosperan a la sombra de corpulentos árboles y en climas templados (Ramírez, 1996). La estructura más distintiva es la flor, que aunque presenta gran variedad de formas sigue un mismo patrón: tres sépalos, dos pétalos y el labelo, que es un tercer pétalo modificado, sin embargo, la diferencia de todas las orquídeas de las demás familias de plantas, es la fusión de los órganos reproductores en una estructura única llamada columna, ubicada en el centro de la flor (Hagaster *et al.*, 2005; Singer, 2009); las flores se agrupan casi siempre en racimos de dos a veinte (Ramírez, 1996).

Están formadas por vástagos organizados en uno ó dos hábitos de crecimiento; en el primero de ellos el desarrollo se da mediante la extensión vegetativa a partir de un meristemo apical que da lugar a un solo eje principal (monopodio) y se le conoce como crecimiento monopodial. En el segundo tipo de crecimiento el eje esta formado por una serie de vástagos generados de manera consecutiva a partir de meristemas o yemas de renuevo, situadas de forma basal, lateral o apicalmente en el vástago

anterior, el conjunto de vástagos forma un eje compuesto (simposio) y el tipo de crecimiento es llamado simpodial. La mayor parte de orquídeas epifitas mexicanas y al parecer todas las terrestres son simpodiales (Hágsater *et al.*, 2005). Las orquídeas alcanzan varios tamaños que pueden ser de metros a unos cuantos milímetros (Ramírez, 1996).

La formación de las semillas tiene gran importancia en algunas plantas ya que son fuente de diversidad de las especies. Por ejemplo, la estructura de las flores en las orquídeas es compleja, por lo tanto, en los eventos de reproducción sexual los mecanismos de polinización y el comportamiento de los polinizadores se han vuelto específicos, en alto grado, para cada especie; es decir hay una fuerte correlación entre la morfología floral y la polinización (Ramírez, 1996; Gerlach, 2003; Singer, 2009); por ejemplo, las abejas y las avispas son los insectos más atraídos por el color o el perfume de las orquídeas. Éstos visitan las flores para recoger el perfume que sirve para atraer a la hembra y al hacerlo colaboran a la polinización de la flor. Una vez realizada la fecundación, se forma una cápsula que contiene miles de diminutas semillas, del tamaño de una partícula de polvo que son esparcidas por el viento y en algunos casos por la lluvia y de las que nacerán nuevas plantas. Una capsula puede encerrar entre tres mil y seis millones de semillas (Ramírez, 1996), que pueden medir 1.0 mm de largo y 0.5-1.0 mm de ancho, tienen una testa gruesa que contiene un embrión con alrededor de 100 células de forma redondeada o esférica; está escasamente diferenciada, no se distinguen raíces, cotiledones y

carece de endospermo y el embrión depende de la relación simbiótica con un hongo (Pierik, 1990; Hágsater *et al.*, 2005).

b) Distribución

La familia de las orquídeas presenta una distribución cosmopolita excepto en los polos y desiertos extremos, encontrándose con gran abundancia y diversidad en las regiones tropicales (Ramírez, 2002 citado por Flores, 2006).

En México, todas las costas situadas al sur del Trópico de Cáncer, desde las costas del Pacífico y las del Golfo hasta las regiones que rebasan los 3500 metros sobre el nivel del mar en los estados de Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Veracruz y Chiapas albergan la mayor riqueza de orquídeas, aunque todos los estados cuentan con al menos alguna especie (Ramírez, 1996 y Flores-Escobar *et al.*, 2008).

c) Orquídeas mexicanas

En México se conocen más de 1200 especies de orquídeas (Hágsater *et al.*, 2005), caracterizándose por su alta proporción de especies endémicas, ya que se han registrado 444 especies o subespecies endémicas que corresponden a 37% del total de taxa registrados en el país; sin embargo, por la destrucción y transformación de sus hábitats, por la extracción masiva de plantas de poblaciones silvestres, dado su alto valor hortícola y comercial, y por las características ecológicas que presentan las especies, como sus bajas tasas de crecimiento, ciclos de vida relativamente largos y el escaso reclutamiento de nuevos individuos en condiciones naturales (Ávila y

Oyama, 2002 y Flores-Escobar *et al.*, 2008). En los dos últimos siglos se han extinguido varias especies de orquídeas en México y a partir de 1998 han desaparecido al menos 22 de ellas (Hágsater *et al.*, 2005); actualmente 181 especies se registran en alguna categoría de riesgo en la norma oficial vigente (NOM-059-SEMARNAT-2001), 72 son endémicas, 58 en la categoría de amenazadas, 107 que requieren protección especial, 15 en peligro de extinción y una especie extinta en la naturaleza (*Laelia gouldiana*) (Ávila y Salgado-Garciglia, 2006).

Hágsater *et al.*, (2005), comenta que la gran mayoría de las orquídeas se pueden propagar con muchísima facilidad; la posible conveniencia de que algunas se encuentren enlistadas en CITES sería únicamente evitar el comercio de especímenes silvestres directamente extraídos de la naturaleza, sin embargo, desde el punto de vista de la reproducción no tienen ningún problema de conservación, incluso la orquídea más cultivada comúnmente, la vainilla, es una especie que en términos demográficos está extinta, es decir, prácticamente no hay vainilla silvestre, pero gracias a la manipulación del hombre se ha logrado la propagación o expansión vegetativa, siendo más factible la reproducción asexual de las orquídeas que la reproducción sexual (Eccardi y Becerra, 2003).

c) Situación y problemática

Debido a las características estructurales de las orquídeas éstas presentan una belleza incomparable entre la gran variedad de flores ornamentales confiriéndoles un alto valor comercial que las hace vulnerables por la sobreexplotación, aunado a ello,

los procesos de polinización de las orquídeas son muy limitantes y específicos ya que existe una correlación evolutiva demasiado estrecha entre la planta y su polinizador. El proceso de germinación también requiere condiciones específicas que dificultan su reproducción, por otro lado, la destrucción de los diferentes ecosistemas disminuye cada vez más su hábitat natural afectando las tasas de crecimiento, ciclos de vida y ecológicos (Hágsater *et al.*, 2005). El problema para su reproducción natural se debe que las semillas están escasamente diferenciadas por lo que no se le distinguen los cotiledones ni las radículas y carecen de endospermos (Pierik, 1990 citado por Flores-Escobar *et al.*, 2008).

Lamentablemente la desaparición de sus nichos ecológicos no sólo se debe a un proceso evolutivo, sino que las actividades antropogénicas como la tala de árboles, los incendios forestales provocados y el saqueo de ejemplares para comercialización son los principales factores que más afectan a las orquídeas; en los últimos 20 años se ha hecho notable la pronta extinción de especies, de hecho la familia de las orquídeas es uno de los mejores ejemplos en los cuales las especies han sido llevadas a la extinción como resultado de actividades humanas; A pesar de los esfuerzos científicos por medio de investigaciones y métodos para la conservación, los avances son muy lentos, mucho más lentos que los procesos de desaparición de los ecosistemas; es por ello que las técnicas de cultivo *in vitro* son una opción muy favorable como estrategia de conservación, por la rápida multiplicación de plantas aunque no garantice con ello la permanencia de las especies en su hábitat natural (Halbinger, 1993, Ávila y Oyama, 2007).

Por otro lado, en México aun no se cuenta con un inventario completo de orquídeas, siendo esta una actividad importante para el desarrollo de planes de conservación de la diversidad de especies de orquídeas, especialmente de aquellas que han sido declaradas amenazadas o en peligro de extinción en la NOM-059-ECOL-2001.

En cuanto a la conservación de especies, se puede mencionar que existen 47 jardines botánicos en el país (Rodríguez, 1997), los cuales tienen como misión el rescate y propagación de plantas en peligro de extinción (Vovides *et al.*, 1997), sin embargo, se desconoce el número exacto de especies que forman las colecciones. En 1994 la SEDESOL publicó que existían 2870 especies, incluyendo 1120 géneros y 186 familias en 22 jardines botánicos, de ese número la mayor parte pertenecía a la familia Cactaceae (454 spp) y Orchidaceae (360 spp) (Rodríguez, 1999). En cuanto a la conservación de áreas naturales se estima que en México existen seis áreas muy diversas, con menos de 100 000 hectáreas cada una, localizadas en diferentes regiones florísticas del país, las cuales poseen 50% del total de orquídeas registradas y que representan tan solo el 0.003% del territorio mexicano (Ramírez, 1996). Con respecto a la sobreexplotación, actualmente todas las especies de la familia Orchidaceae se encuentran listadas en los apéndices I o II de las CITES con el fin de regular su comercio (Flores, 2006). A pesar de ello, los esfuerzos por proteger los recursos naturales son muy limitados y las leyes para regular su aprovechamiento son insuficientes o no se aplican en su totalidad debido a la falta de difusión, promoción, inspección, vigilancia y compromiso, repercutiendo por lo tanto en la continua extinción de especies (Aguirre-León, 2005).

2. Estrategias de conservación

A pesar de que existe una gran diversidad de orquídeas en el país, muchas de ellas ya se encuentran registradas en alguna categoría de riesgo debido a su alto grado de sobreexplotación y a la destrucción de su hábitat, es por ello que se deben de implementar métodos de conservación de la biodiversidad en general.

Una de las estrategias de conservación es llamada *in situ*, que tiene como objetivo la preservación de la diversidad biológica en sus hábitats y áreas de distribución natural (Hernández, 1994), y como ejemplo de este tipo de conservación es el establecimiento de áreas naturales protegidas. Otra estrategia es la conservación *ex situ* en donde, como el término lo indica, la finalidad es preservar organismos en un medio distinto a aquel en el cual evolucionaron y comiencen a adaptarse en uno nuevo. Un ejemplo de los ambientes controlados son los invernaderos, banco de semillas y bancos de germoplasma *in vitro* empleando el cultivo de tejidos vegetales. Sin embargo, pese a los trabajos de conservación o a la protección de una especie, el uso tradicional sigue propiciando colectas intensivas en los sitios en los que crecen de forma silvestre; de ahí la necesidad de buscar la forma de reproducción (Fay, 1994).

Las técnicas de conservación *ex situ* son un complemento de los métodos *in situ* y en algunos casos es la única opción para algunas especies (Mauder *et al.*, 1998; Ramsay *et al.*, 2000 citados por Sarasan *et al.*, 2006). Arditti y Krikorian (1992)

comenta que las orquídeas presentan una variabilidad genética muy importante tanto para la flora como para la fauna silvestre, sin embargo, en la conservación *in situ* se corre un mayor riesgo de perder esta variabilidad, por lo que la conservación *ex situ* adopta un papel predominante en estas situaciones (Ossenbach *et al.*, 2007). El incremento y el mantenimiento de bancos de semillas, así como el uso de técnicas *in vitro* han habilitado a los jardines botánicos para contribuir al éxito de la conservación de numerosas plantas amenazadas (Maunder *et al.*, 2001; Pritchard *et al.*, 2004 citados por Sarasan *et al.*, 2006).

3. Cultivo de tejidos vegetales

Este proceso inicia por la selección de material que puede ser la semilla, sin embargo, cuando éstas no son viables, se pueden utilizar explantes que tengan actividad meristemática, por ejemplo el ápice de los brotes, de este modo, puede pasar que la integridad genética de las plantas sea retenida sin el riesgo de inducir variación somaclonal (Dodds, 1991; citado por Fay, 1994).

El fragmento aislado de la planta (explanete), es sembrando en condiciones de asepsia y se le proporcionan las condiciones físicas como luz, temperatura, humedad así como químicas (nutrientes) apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido (Doods y Roberts, 1982; Jiménez, 1998 citados por Fay, 1994; Razdan, 2003). Dentro del cultivo de tejidos vegetales se encuentra la micropropagación que permite obtener una gran cantidad de plantas en un periodo corto de tiempo, que son llamadas vitroplantas y pueden obtenerse por tres vías: 1)

de yemas pre-existentes (meristemos), los cuales están preparados para crecer y proliferar; 2) en la organogénesis, el nuevo órgano se desarrolla a partir de tejidos no organizados (callo) y es denominada organogénesis indirecta o directamente del explante denominada organogénesis directa y 3) a través de la formación de embriones somáticos, por organogénesis directa o indirecta y que son parecidos a los embriones cigóticos, los cuales pueden crecer como plántulas normales (George *et al.*, 2008).

Murashige en su estudio realizado en 1974 define las diferentes etapas de la micropropagación (Murashige, 1994; citado por George *et al.*, 2008):

Etapa 0: Selección de la planta madre y preparación. Consiste en la sección de la planta de donde se obtendrán los explantes, el material debe ser sano y libre de patógenos.

Etapa I: Establecimiento de un cultivo aséptico. En esta etapa se realizan los ensayos de desinfección del material vegetal pertinentes para su establecimiento en condiciones asépticas, las sustancias sus concentraciones y tiempos dependen del tipo de planta. Después de la fase de desinfección se procede al cultivo *in vitro*, en el cual se le adiciona al medio de cultivo reguladores del crecimiento para promover su propagación. Los reguladores de crecimiento más empleados son las citocininas y auxinas solas o en combinación.

Etapa II: Multiplicación. En esta etapa se promueve la proliferación de los brotes, colocando el explante adecuado en la combinación de reguladores del crecimiento.

Etapa III: Enraizamiento. Cuando hay suficientes brotes son transferidos a un medio para enraizar, sin reguladores de crecimiento o auxinas (Fay, 1994). Cuando las raíces se han formado las plantas están listas para llevarlas al exterior y se procede a la transferencia, en la cual las plantas que son producidas *in vitro* requieren un periodo de aclimatización (George y Sherrington, 1984; Debergh y Zimmerman, 1991; citados por Fay, 1994).

Debergh y Maene (1981) proponen subdividir la Etapa III en:

Etapa IIIa: La elongación de los brotes y la preparación de brotes uniformes para la etapa IIIb.

Estado IIIb: El enraizamiento y el crecimiento inicial de los brotes producidos *in vitro* bajo condiciones *in vivo* (George *et al.*, 2008).

Etapa IV: Aclimatización. Consiste en la adaptación de las plantas provenientes de *in vitro* al ambiente natural de una forma gradual modificando las condiciones que prevalecen *in vitro* como la alta humedad relativa, baja intensidad luminosa, temperatura constante, escaso intercambio gaseoso y medios ricos en nutrientes (Agramonte *et al.*, 1998 citado por Roberts *et al.*, 1990). Las plantas pueden ser aclimatizadas desde que están en la Etapa IIIa, una técnica es colocando los contenedores en estantes enfriados para que la condensación se dirija hacia el fondo del frasco y la humedad del contenedor se reduzca. Esto permite reducir la pérdida de agua de los brotes y mejorar la sobrevivencia durante la aclimatización (Maene y Debergh, 1986; citados por Roberts *et al.*, 1990).

Al utilizar la técnica de micropropagación se debe tomar en cuenta que el desarrollo y crecimiento de las plantas cultivadas *in vitro* también está determinado por numerosos y complejos factores como la genética de las plantas; los nutrientes (agua, macro y micro elementos y el azúcar); factores físicos (luz, temperatura, pH, y concentraciones de CO₂); algunas sustancias orgánicas (reguladores y vitaminas); el número de subcultivos (Pan y Standen, 1998) y que muchas plantas mueren durante el trasplante del cultivo *in vitro* a condiciones *ex vitro* (Min-Wha *et al.*, 2005). Debido a que los contenedores cerrados que se utilizan para prevenir la contaminación disminuyen la turbulencia del aire aumentando el grosor de la hoja, el insumo de CO₂ y de gases producidos por las plantas dentro del contenedor, condiciones que conllevan a que la planta presente anomalías morfológicas, anatómicas y fisiológicas (Kozai, 1991; Pospíšilová *et al.*, 1992, 1997; Buddendorf-Joosten y Woltering, 1994; Desjardins, 1995; Kozai y Smith, 1995; citados por Pospíšilová *et al.*, 1999). Por lo tanto, después del trasplante *ex vitro* usualmente necesitan algunas semanas de aclimatización disminuyendo gradualmente la humedad del aire (Preece y Sutter, 1991; Kadlec, 1997 y Bolar *et al.*, 1998; citados por Pospíšilová *et al.*, 1999).

a) Ventajas y desventajas del cultivo *in vitro*

Dentro de las ventajas de la propagación *in vitro* se pueden considerar las siguientes: el cultivo se inicia con muy pocos fragmentos de la planta (explantes) y después los brotes pequeños o embriones son propagados; se requiere poco espacio para el mantenimiento de las plantas y se obtiene un gran número de ellas, la propagación

es realizada en condiciones asépticas, con éste método existe mayor probabilidad de que las plantas estén libres de virus, existe mayor posibilidad de ajustar los factores que influyen la regeneración vegetativa como los niveles de nutrientes y reguladores de crecimiento, luz y temperatura, en poco tiempo se obtienen un gran número de vitroplantas, las plántulas necesitan poca atención entre los subcultivos, además debido a que es un sistema clonal, todas las características genotípicas del material inicial empleado se mantienen, el proceso no es afectado por las condiciones externas y variaciones climáticas como sequías, heladas, altas temperaturas, etc., debido que se realiza bajo ambientes controlados (Collin y Edwards, 1998, George *et al.*, 2008 y Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999); el cultivo *in vitro* también permite la obtención de plantas para análisis de DNA, estudios ecológicos y usos comerciales (Sarasan *et al.*, 2006) y es una gran herramienta para la producción de plantas de lenta propagación sexual o vegetativa, como por ejemplo las orquídeas (Rao, 1997 citado por Oliva *et al.*, 1985).

Sin embargo también, existen algunas desventajas tales como producción especializada y altos costos, las plantas obtenidas son en principio muy pequeñas y algunas veces tienen características indeseables, los explantes crecen en un medio que contiene sacarosa o carbón y las plantas obtenidas en este medio de cultivo no son fotosintéticas; como crecen dentro de vasos o vasijas plásticas con alta humedad relativa las plantas jóvenes son más susceptibles a perder agua en un ambiente externo, lo anterior ocasiona que se obtenga una producción de plantas con trastornos morfológicos y fisiológicos como cutícula delgada y pocas raíces,

requiriendo una delicada manipulación para evitar el daño y se necesitan periodos extensivos de investigación y desarrollo para establecer las condiciones de cultivo para nuevas especies o variedades que son difíciles de regenerar o enraizar (Collin y Edwards, 1998, George *et al.*, 2008 y Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999).

4. Características de las plantas cultivadas *in vitro*

a) Hiperhidratación

Dentro de los estudios realizados en las plantas cultivadas *in vitro* es importante analizar la relación anatómica e histológica de los cambios o deformaciones que ocurren en las plantas, fenómeno llamado de hiperhidratación, que es una anomalía morfológica que se observa en las plantas cultivadas *in vitro* (Kevers *et al.*, 1984, citado por Tsay *et al.*, 2006).

Anteriormente se le daba el término de vitrificación (Debergh *et al.*, 1981; Kevers *et al.*, 1984; Gaspar, 1991 citados por Kevers *et al.*, 2004; Ziv, 1991), a las plantas *in vitro* que presentan un aspecto vidrioso, translúcido, vitriscentes, pero la vitrificación se refiere a procesos físicos del agua y no a los procesos biológicos de las plantas (Ziv, 1991), por lo que se estableció el término de hiperhidratación.

Este fenómeno no solo se limita a los brotes, también algunos callos (Crèvecoeur *et al.*, 1987; citado por Kevers *et al.*, 2004), los brotes hiperhidratados tienen pocas raíces, generalmente no sobreviven en la etapa de aclimatización y cuando lo logran, crecen plantas mal formadas, los tejidos muestran también cambios bioquímicos como: la reducción del peso seco, poca lignina, poca celulosa, bajo contenido de calcio, poca clorofila, que ocasiona tejidos traslúcidos y probablemente baja

capacidad fotosintética (Gaspar, 1991; citado por Kevers *et al.*, 2004). Así mismo los brotes hiperhidratados se dañan con facilidad por la desecación y tienen bajos niveles de sobrevivencia cuando son subcultivados o transferidos a un ambiente externo (George *et al.*, 2008).

Se considera que los procesos de hiperhidratación son generalmente reversibles, la morfología, anatomía y fisiología de las plantas cultivadas *in vitro* pueden ser reparadas después de transferir a condiciones *ex vitro*, los cambios más importantes son el desarrollo de la cutícula, pared epicuticular y transpiración efectiva regulada por los estomas, lo que conduce a la estabilización o control de agua (Pospíšilová *et al.*, 1999; Kevers *et al.*, 2004)

Sin embargo, no siempre es así en hojas hiperhidratadas completamente formadas y maduras, ya que no es posible recuperar su estructura normal y garantizar que sobrevivan al trasplante, pero sí es reversible en los nuevos brotes u hojas formadas en brotes hiperhidratados después de que son transferidos a un medio *ex vitro* o a un invernadero, así los nuevos brotes pueden llegar a tener una morfología y anatomía similar al de las plantas normales (Majada *et al.*, 2000; Kevers *et al.*, 2004)

b) Estomas

Es importante enfatizar en el estudio de los estomas porque permiten, por los movimientos regulados de abrir y cerrar, la mayor parte del intercambio gaseoso entre las hojas de las plantas y la atmósfera. Logran un delicado balance entre dos de los fundamentales requerimientos de las plantas: la adquisición de CO₂ para la

fotosíntesis y prevenir la pérdida excesiva de agua por la transpiración. En caso de que falle el aparato estomático para regular la pérdida de agua, en pocos minutos puede causar severos daños o la muerte. El grado necesario para controlar el intercambio gaseoso es logrado por un conjunto muy complicado de respuestas estomáticas, para los factores medioambientales y para el estado fisiológico de las plantas (Mansfield, 1994).

En la micropropagación de plantas de la especie *Delphinium* se mostró que los rangos de la pérdida de agua de las hojas desprendidas no se debió a las altas tasas de transpiración de la cutícula, pero si se asociaron con la falta de control de los estomas (Santamaría *et al.*, 1993; citados por Santamaría y Kerstiens, 1994). Conner y Conner en 1984, refieren que los estomas de las hojas de *Delphinium* que crecieron *in vitro* no cerraron en respuesta a la desecación y que con la aclimatización de las plantas (un mes después de ser transplantadas) muestran un mejor control de pérdida de agua, concluyendo que la rápida pérdida de agua de las plantas *in vitro* se atribuye primordialmente a la falta de cierre de los estomas (Santamaría y Kerstiens, 1994).

Al disminuir el potencial del agua en el medio de cultivo, existe menor cantidad de agua transportada por la hoja decreciendo así la apertura de los estomas aun cuando el potencial de agua en la hoja se mantenga constante (Davies *et al.*, 1986; Golla *et al.*, 1986; citados por Kaiser, 1987). Por otro lado, el cierre no uniforme de los estomas puede causar déficit de agua a lo largo de la hoja con un decremento local

de la capacidad fotosintética debido al déficit hídrico (Laisk 1983; Sharkey, 1984; citados por Kaiser, 1987).

Mansfield (1994), menciona que hay diferentes formas por las que se puede inducir la función anormal de los estomas y que pueden ser categorizadas como disturbios en la relación normal de los mecanismos de las células de la epidermis y cambios en los factores que determinan la rigidez de las células guarda. El mal funcionamiento de los estomas conlleva a que las plantas cultivadas *in vitro* tengan que enfrentarse al déficit de agua, por lo que es importante mejorar la actividad de la misma planta para que continúe con su desarrollo normal, para lo cual es importante identificar y seleccionar los rasgos que contribuyan a evitar la deshidratación, es decir, que les permitan tener un uso eficiente de agua (Ludlow y Muchow, 1990 citados por Mansfield, 1994). Algunos rasgos importantes incluyen la fenología de la planta, tolerancia a la desecación, extracción eficiente del agua, uso eficiente del agua, características que dependen de los estomas y de la cutícula principalmente.

La morfología y densidad de los estomas puede estar alterada por cambios en las condiciones ambientales del medio *in vitro* y muchas investigaciones reportan que los estomas de plantas cultivadas *in vitro* muestran inhabilidad de cerrar cuando se remueven por primera vez del cultivo (Preece y Sutter, 1991).

c) Estrés hídrico

Las respuestas celulares de la deshidratación varían dependiendo del grado de déficit del agua, la duración del estrés y la especie. Además, las respuestas celulares

específicas varían dependiendo del tipo de órgano, tipo de célula y estado de desarrollo de la planta. Las respuestas celulares al déficit de agua se pueden describir de la siguiente forma: primero, decrece el contenido de agua en la planta que a la vez inhibe el crecimiento (brotes>raíz) obstruyendo la actividad fotosintética, decrece la transpiración, entre otras. Las respuestas al déficit de agua pueden dividirse en tres categorías: (Mullet y Whitsiit, 1996).

- La deficiencia de agua induce la inhibición de los procesos para el crecimiento.
- Los cambios celulares dan como resultado impactos metabólicos en el cierre de los estomas.
- Reducción de la transpiración y fotosíntesis.

Lo que significa que la respuesta celular para amortiguar el déficit de agua es inhibir el crecimiento dependiendo de la etapa de desarrollo de la planta y al órgano o tejido examinado (Creelman *et al.*, 1990; citado por Mullet y Whitsiit, 1996).

El cultivo *in vitro* en una atmósfera saturada de agua languidece (marchita) rápidamente la planta, cuando es transferida a invernadero o a condiciones de campo. El agua se pierde rápidamente por las hojas porque los estomas fallan al responder a estos estímulos que normalmente inducen al cierre (Brainer y Fuchigami, 1982 y Ziv *et al.*, 1987 citados por Roberts *et al.*, 1990) y un pobre desarrollo de la pared epicular ayuda a que se pierda agua a través de la cutícula (Fuchigami *et al.*, 1981 y Sutter *et al.* 1979, citados por Roberts *et al.*, 1990).

Todos los desordenes manifiestos en las plantas cultivadas *in vitro* impiden el establecimiento *ex vitro*, sin embargo, los brotes *in vitro* presentan ciertos requerimientos para su desarrollo como alta humedad, factores nutrimentales, minerales y carbohidratos, reguladores de crecimiento y baja intensidad luminosa; siendo los mismos requerimientos la mayor causa de malformación de brotes (Ziv, 1986; Gaspar *et al.*, 1987; citados por Ziv, 1991).

El desarrollo de plantas normales *in vitro* puede estar manipulado si se controla el microambiente; como la humedad, el potencial osmótico del agua en el medio, la temperatura y la intensidad luminosa (George 1996 citado por George *et al.*, 2008). Un buen balance de minerales, un adecuado suministro de carbohidratos y los niveles de reguladores de crecimiento en el medio, son los principales factores en la expresión morfogénica de las plantas *in vitro*. En general, las condiciones *in vitro* deben ser muy parecidas en todo lo posible a las condiciones óptimas de crecimiento *ex vitro*. La aclimatización *in vitro* antes del trasplante y exponer las plantas a un ligero estrés en la tercera etapa del cultivo reducen los problemas de hiperhidricidad (Ziv, 1992; citado por George *et al.*, 2008).

5. Aclimatización

Transferir y aclimatizar las plantas de un medio *in vitro* al medio *ex vitro* es el último pero frecuentemente el más difícil de los pasos dentro de la técnica de micropropagación (Preece y Sutter, 1991; Kadlecek *et al.*, 2001).

La aclimatización es la habilidad de un individuo para ajustar su fisiología o atributos estructurales en la escala de segundos o estaciones sin un genotipo singular. Durante la aclimatización un organismo altera su homeostasis para enfrentar los cambios ambientales (Kevers *et al.*, 2004); y es una etapa que puede garantizar mayor sobrevivencia de las plantas, pero es necesario tomar mayores cuidados ya que un descuido puede resultar en la pérdida de un gran número de plantas y, a pesar de que parezca que tengan una apariencia normal, pueden tener modificaciones en su estructura o metabolismo (George y Sherrington, 1984; Debergh y Zimmerman, 1991; citados por Fay, 1994).

Durante la aclimatización el espesor y el desarrollo de la cutícula de la hoja generalmente se incrementa, la densidad estomática decrece, la apertura es anormal y la forma del estoma cambia de circular a elíptica; influye en la regulación de la transpiración lo que conlleva a estabilizar los rangos de agua, además también se reporta un incremento en el contenido de clorofila y la tasa fotosintética. También puede acelerar el endurecimiento de las plantas después del trasplante al disminuir la tasa de transpiración (George y Sherrington, 1984; Debergh y Zimmerman, 1991; citados por Fay, 1994; Pospíšilová *et al.*, 1999).

A) Modificaciones morfológicas y fisiológicas de las plantas durante la aclimatización

Muchos de los factores ambientales están asociados a los procesos metabólicos de las plantas, por ejemplo, la variación de luz que suministra la energía para la fotosíntesis, la deficiencia de agua afecta el comportamiento de los estomas y limita

el suministro de dióxido de carbono (Smirnoff, 1995; citado por Kevers *et al.*, 2004); dichos cambios ambientales conllevan a que las plantas pasen por una etapa de estrés, sin embargo, cuando hay una variación de los factores ambientales óptimos, las plantas pueden tener cierta flexibilidad a los cambios cuando éstas son aclimatizadas.

Debido a las características fisiológicas y morfológicas de las plantas micropropagadas, éstas necesitan de una aclimatización gradual ya que al transferirlas a condiciones *ex vitro* sufren algunos disturbios o estrés. Se puede señalar que cuando las raíces son removidas del medio de cultivo (agar) y se transplantan en un sustrato diferente (suelo), la absorción de agua y nutrientes puede verse afectado, probablemente porque los pelos radicales se dañan durante este proceso y la segunda fuente de estrés de las plantas es el enfrentarse al incremento de luz; por lo tanto, sugieren que durante el cultivo *in vitro* es importante una etapa de aclimatización para un mejor desarrollo *ex vitro* (Kadlecek *et al.*, 2001).

Lo anterior puede ayudar a que después de transferir las plantas cultivadas *in vitro* a un invernadero, se presenten diferentes cambios en la morfología y anatomía de la hoja, tales como su grosor, diferenciación en el mesófilo, número y estructura de los cloroplastos (Kadlecek *et al.*, 2001). Así mismo, la aclimatización puede acelerar el endurecimiento de las plantas después del trasplante disminuyendo la tasa de transpiración (Pospíšilová *et al.*, 1999).

Otro aspecto importante es considerar que las plantas cultivadas *in vitro* cuentan con suficiente agua proporcionada en el medio de cultivo para su desarrollo y que

durante el proceso de aclimatización generalmente sufren un proceso de deshidratación, que afecta el crecimiento de las mismas, es así como la respuesta a la deficiencia de agua ha ganado especial atención en las investigaciones científicas sobre el comportamiento fisiológico de las plantas, por lo tanto los estomas son uno de los temas esenciales, ya que son los responsables de los cambios en la humedad del aire y al no funcionar correctamente, a menudo también decrecen los rangos fotosintéticos (Kaiser, 1987).

a) Densidad estomática

Pospíšilová *et al.* (1999), reportan que en los estudios realizados por Wetzstein y Sommer, 1983; Noé y Bonini, 1996 y Tichá *et al.*, 1999, para evaluar el comportamiento de las plantas sometidas a una etapa de aclimatización en plántulas de *Liquidambar styraciflua*, *Vaccinium corymbosum* y *Nicotiana tabacum* respectivamente, se observa una disminución de la densidad estomática después de ser transplantadas. En *Nicotiana tabacum*, después de un corto periodo de aclimatización no se observan cambios significativos en la densidad estomática de la epidermis adaxial y abaxial, pero el número de estomas en la hoja se duplica debido a que crece considerablemente el área de la hoja (Pospíšilová *et al.*, 1998 citado por Pospíšilová *et al.*, 1999). En plantas de *Prunus serotina* y *Rhododendron spp.*, incrementa la densidad estomática y el tamaño de los poros estomáticos después de ser transplantadas (Waldenmaier y Schmidt 1990, Drew *et al.* 1992 citados por Pospíšilová *et al.*, 1999).

b) Contenido de clorofila

Con respecto a los contenidos de clorofila *a* y *b*, Trillas, Rival, Synková y Pospíšilová (1998) señalan que se incrementa el contenido de clorofila *a* y *b* después del trasplante; también se reporta que un efecto similar es originado por un crecimiento fotoautotrófico en plantas de *Nicotiana tabacum*, pero en un crecimiento fotomixotrófico el contenido de clorofila *a* y *b* decrecen durante la primer semana después de ser transplantadas (Kadlecek, 1997 y Kadlecek *et al.* 1998; citados por Pospíšilová *et al.*, 1999), estos resultados son similares a los reportados por Premkumar *et al.*, 2001, quienes encontraron bajas concentraciones de clorofila en tejido proveniente de plantas de aguacate, roble y fresa cultivadas *in vitro*, lo que hizo difícil la sobrevivencia de dichas plantas al momento de transferirlas a suelo.

Flores-Escobar *et al.* (2008), reportan que el número y longitud de las raíces es también favorable para el establecimiento de las plantas fuera del cultivo *in vitro* en el que se han desarrollado, debido a que las orquídeas epífitas se distinguen por la presencia de raíces aéreas, mismas que se utilizan tanto para nutrirse como para anclarse a las plantas hospederas. La correlación encontrada entre las variables número y longitud de raíces es importante porque permitirán una mayor sobrevivencia de *Oncidium stramineum* durante el establecimiento en invernadero. Aunque en las especies epífitas como *Oncidium stramineum* la función principal de la raíz es el anclaje (Arditti, 1992 citado por Flores-Escobar *et al.*, 2008), también son capaces de fotosintetizar dado que contienen clorofila (Hágsater *et al.*, 2005).

c) Control de la pérdida del agua

Debido a que las plantas *in vitro* a menudo muestran problemas para controlar la pérdida de agua cuando se sacan del contenedor, se tiene como resultado una baja sobrevivencia al ser transferidas al invernadero (Preece y Sutter, 1991; citados por Santamaría y Kerstiens, 1994), para incrementar la sobrevivencia se han realizado modificaciones a diferentes factores, como la intensidad luminosa, la composición de medio de cultivo, aunado a diferentes técnicas que permiten la mejor adaptación de la planta al ser transferida al suelo (Roberts *et al.*, 1990).

B) Técnicas de aclimatización.

Las técnicas más satisfactorias son aquellas que se dirigen a disminuir la humedad relativa, elevar los niveles de luz, lograr un crecimiento autotrófico y un ambiente aséptico. En 1979 Wardle y colaboradores reportaron el uso de un desecante en el interior del contenedor para bajar la humedad relativa (Preece y Sutter, 1991); otra técnica de aclimatización es destapar el contenedor varios días antes de transferir las plantas; en 1983 dos autores Millar y Pocock, sugieren remover las tapas del contenedor pocos días antes de colocarlas en el ambiente en donde se van a establecer (Ziv, 1986; citado por Preece y Sutter, 1991).

Se reporta que en plántulas de orquídeas reproducidas *in vitro* bajo condiciones de alta humedad, tendrán cutículas débiles por lo que necesitan acostumbrarse gradualmente a medios más secos antes de ser transplantadas; una forma de

aclimatizar las plántulas es aflojar las tapas gradualmente para permitir la entrada de pequeñas cantidades de aire (Sheena, 2000).

Otra técnica para aclimatizar las plantas es emplear contenedores ventilados que favorecen el movimiento del agua a través de la planta, dicha ventilación debe de estar completamente controlada de tal forma que no se contamine el medio de cultivo (Santamaría *et al.*, 2000). En el proceso de la aclimatización es importante tomar en cuenta que los rangos de crecimiento y las características morfológicas y fisiológicas de las plantas cultivadas en condiciones *in vitro* pueden estar influenciadas por el microambiente físico o químico del contenedor (Walker *et al.*, 1988, citado por Tsay *et al.*, 2006). Al utilizar la técnica de ventilación es importante mantener la asepsia del cultivo, por lo que es esencial cubrir el contenedor con una membrana impermeable. Diferentes tipos de membrana son utilizados, algunas restringen el intercambio gaseoso entre la atmósfera del contenedor y el ambiente externo (Buddendorf-Joosten y Woltering, 1994; citados por Tsay *et al.*, 2006), lo cual puede resultar en una pobre aireación y en la hiperhidricidad del cultivo (Tsay *et al.*, 2006).

Uno de los objetivos de la aclimatización por medio de la ventilación de los contenedores, es disminuir la humedad relativa (HR) que existe dentro del frasco, ya que el disminuirla durante el cultivo *in vitro* puede resultar muy favorable para mejorar la calidad de las plantas. Se ha reportado que para algunas especies el bajar la HR en el cultivo *in vitro*, permite que sobrevivan a las condiciones *ex vitro* con mayor facilidad (Maene y Debergh, 1987; Vanderschaeghe y Debergh, 1987; citados por Buddendorf-Joosten y Woltering, 1996).

En la tabla 1 se muestran trabajos realizados sobre la aclimatización de plantas cultivadas *in vitro*, y se hace referencia sobre el tipo de ventilación que utilizaron, así como el aspecto físico y biológico de las plantas.

Tabla 1. Principales trabajos sobre la aclimatización de plantas cultivadas *in vitro*.

Especie	Ventilación	Modificaciones al medio de cultivo	Objetivo	Resultados	Autor
<i>Chrysanthemum</i>	Contenedor con filtro bacteriano insertado en la tapa y tapones de celulosa	Medio MS Líquido más paclobutrazol	Reducir la humedad dentro del contenedor	Plantas más resistentes al marchitamiento, crecimiento muy lento después del trasplante.	Roberts <i>et al.</i> , 1990
<i>Solanum tuberosum</i>	Tapas de PP con filtro (47 mm de diámetro y poros de 0.22 µm; Millipore GVHP 4700) sobre las tapas en perforaciones de 30 mm de diámetro			Disminución en la concentración de CO ₂ con el filtro Millipore. Incremento en la transpiración y/o evaporación, desecación del medio. Decremento de la humedad relativa	Buddendorf-Joosten y Woltering, 1996
<i>Delphinium</i> y <i>Hosta</i>	Contenedores de PVC con aperturas circulares de diferente diámetro y cubiertas con papel filtro Whatmann No. 1 de 1.5 cm de diámetro		Reducir la humedad relativa dentro del contenedor	No se logró reducir la humedad relativa. En <i>Delphinium</i> la multiplicación y sobrevivencia fue mejor en contenedores con apertura pequeña y en <i>Hosta</i> los rangos de crecimiento son menores en los contenedores con aperturas grandes	Murphy <i>et al.</i> , 1998
<i>Dianthus caryophyllus</i>	SUN CAP (Sigma) diferentes diámetros		Comparar la anatomía de las plantas cultivadas <i>in vitro</i> bajo diferentes rangos de ventilación durante la fase de aclimatización.	Variaciones anatómicas por los diferentes rangos de ventilación. El bajo potencial de agua en el contenedor redujo la proliferación o crecimiento de los brotes pero con una morfología normal.	Majada <i>et al.</i> , 2000
<i>Cocos nucifera</i>	Cajas Magenta GA-7 con orificio de 133 mm ² tapados con: (PP), (PVC), (W), (S)			Las plantas con W mostraron bajos niveles de pérdida de agua, aperturas estomáticas estrechas que las plantas cultivadas con PP, PVC o S. PP y PVC muestran resultados intermedios: altos niveles de pérdida de agua y, aperturas estomáticas abiertas.	Talavera <i>et al.</i> , 2001
<i>Lycopersicon pennellii</i>	Cajas de 375 ml cerrados o ventilados, con membrana 0.3 µm NPS.	MS con o sin 100 mM NaCl. MS adicionado con NaCl (0.22Mm Na ⁺ y 6.2 mM Cl ⁻).	Comparar crecimiento, acumulación de iones K ⁺ , Na ⁺ y Cl ⁻ y pérdida de agua, en condiciones <i>in vitro</i> con o sin ventilación.	Las sales incrementan la resistencia a la pérdida de agua. Incrementar la ventilación mejoró el desarrollo y crecimiento de las hojas y los brotes. También se incrementó la ventilación de K ⁺ , Na ⁺ y Cl ⁻ .	Mills y Tal, 2004.

Tabla 1. Continuación... Principales trabajos sobre la aclimatización de plantas cultivadas *in vitro*.

Especie	Ventilación	Modificaciones al medio de cultivo	Objetivo	Resultados	Autor
<i>Cattleya aurantiaca</i> <i>Encyclia adenocaula</i> <i>Epidendrum radicans</i> <i>Euchile citrina</i> <i>Laelia albida</i> , <i>Laelia autumnalis</i> , <i>Laelia speciosa</i> , <i>Oncidium cavendishianum</i> <i>Oncidium tigrinum</i>	Frascos perforados mantenidos en condiciones no controladas de luz y temperatura por 24 hrs	MS con 100% de nutrientes y 40 g/L de sacarosa previo al trasplante		Sobrevivencia por arriba del 70%. <i>Laelia speciosa</i> , del 98%	Ávila y Salgado-Garciglia, 2006
<i>Scrophularia yoshimurae</i>	Frascos de 500 ml cubiertos con dos capas de láminas de aluminio (AF) o 4 capas de papel farmacéutico (DP).	MS con 1.0 mg l ⁻¹ BA y 0.2 mg l ⁻¹ ANA.	Evaluar la influencia e deferentes factores, tales como nula ventilación, tipo de explante, reguladores de crecimiento.	Con AF hubo una correlación entre el número de brotes formados y la hiperhidratación. Con DP decrece el número de brotes con hiperhidratación ya que incrementa la aireación.	Tsay <i>et al.</i> 2006.

Polipropileno (PP), Policloruro de vinilo (PVC), Papel filtro Whatman (W), Sellado (S), Hoja fina de aluminio (Aluminum Foil - AF), papel farmacéutico (Pharmaceutical dispense paper-DP), (NPS)

De acuerdo a los trabajos descritos en la tabla 1, no se puede definir el tratamiento de ventilación más adecuado para aclimatizar las plantas, ya que los resultados obtenidos en cada uno de ellos son diferentes. Esto probablemente se deba al tipo de medio de cultivo empleado, al sistema de ventilación, a los factores ambientales o a la especie utilizada, pero no hay un patrón que determine con qué tratamiento es mejor trabajar, por lo que es importante realizar diferentes estudios con la especie de interés hasta obtener el resultado esperado. En el caso de los trabajos realizados con orquídeas (resaltado en negritas) se identifica que el porcentaje de sobrevivencia fue similar para 8 especies (70%), en cambio el tratamiento fue más favorable para *L. speciosa* ya que presentó una sobrevivencia del 98%

La importancia de regular la humedad relativa del contenedor en la micropropagación es por el impacto en la fisiología del estoma (Ziv, 1991), si la humedad relativa del contenedor es reducida, la fisiología del estoma y la producción de la pared epicular mejoran (Short *et al.*, 1987; y Wardle *et al.*, 1983; citados por Roberts *et al.*, 1990). Lo cual está demostrado en algunos estudios realizados que se mencionan a continuación.

En el cultivo *in vitro* de *Prunus cerasus* con alta humedad relativa se reportó un mal funcionamiento de los estomas (Marine *et al.*, 1988; citado por Ziv, 1991) y en *Prunus insititia* con alta humedad relativa se observó la reducción de estomas en el cultivo (Brainerd *et al.*, 1981 citados por Ziv, 1991).

Al trabajar con un 70 u 80% de humedad relativa en plantas de *Dianthus caryophyllus* se incrementó el contenido de clorofila (Dolev 1986 y Ziv 1986 citados por Ziv 1991) y en el cultivo de *Chrysanthemum morifolium* se reportó un funcionamiento normal de los estomas incrementando la fotosíntesis (Ziv, 1991).

Una importante propiedad del cultivo *in vitro* es el rango de ventilación de los contenedores; mientras mayor es la tasa de ventilación, más pequeña es la diferencia de la composición gaseosa adentro y afuera del contenedor (Buddendorf-Joosten y Woltering, 1996).

Majada *et al.* (2000), registraron que existen modificaciones en la anatomía y morfología de plantas cultivadas *in vitro* de *Dianthus caryophyllus* al ser cultivadas bajo diferentes regímenes de ventilación, ya que aunque hay reducción en la proliferación y crecimiento de los brotes se mejora la morfología de las plantas, por lo tanto, es importante determinar si es conveniente obtener bajos rangos de multiplicación o mejorar la calidad de las plantas al utilizar la ventilación de contenedores durante la etapa de aclimatización.

Se sugiere que la ventilación es necesaria cuando la respuesta de cualquier célula, tejido y órgano de la planta es comparado bajo condiciones *in vitro* (Mills y Tal, 2004). Además se ha reportado que el tipo de ventilación afecta el intercambio gaseoso, la disponibilidad de agua, micronutrientes y el balance de hormonas (Kataeva *et al.*, 1991; citado por Tsay *et al.*, 2006).

6. Micropropagación de orquídeas

Las orquídeas fueron las primeras plantas propagadas *in vitro* a partir de la siembra de semillas, simbiótica y asimbióticamente. El método de micropropagación inició en 1949 con la orquídea *Phalaenopsis*; sin embargo, la primer orquídea propagada *in vitro* fue *Cymbidium* con fines comerciales (Arditti y Krikorian, 1996).

Ávila y Salgado-Garciglia (2006) citan que dada la importancia hortícola y comercial de las orquídeas, se han desarrollado diversos métodos de propagación, tanto sexual, a través de semillas, como asexual con el cultivo de segmentos vegetativos (explantes).

Las orquídeas se han estado reproduciendo a partir de semillas usando métodos de cultivo *in vitro* en el Real Jardín Botánico de Kew desde antes de 1960, y en 1974 se estableció un laboratorio de micropropagación en donde se llevaron a cabo diferentes trabajos que permitieron ampliar los rangos de plantas cultivadas. En 1993 se tenía el dato de que aproximadamente 1000 especies de plantas estaban cultivadas *in vitro* (Fay, 1994; Sarasan, *et al.*, 2006). Más de 250 géneros de orquídeas han sido propagados exitosamente en Kew, incluyendo especies de *Angraecum*, *Paphiopedilum*, *Phragmoedum* y *Cypripedium*, muchas de las cuales están amenazadas. En las investigaciones realizadas por Sarasan *et al.*, (2006) reporta que la mayoría de las orquídeas tropicales germinan rápidamente en cultivo axénico, sin embargo muchas orquídeas de climas templados no germinan y se tienen que usar técnicas en las que se deben incluir micorrizas para la

germinación, por lo tanto el mayor número de trabajos se realizan con orquídeas terrestres, pero los experimentos con especies epífitas se ha incrementado.

La situación y problemática de las orquídeas a conllevado a que muchas de las investigaciones de cultivo de tejidos vegetales se realicen con alguna especie de esta familia ya sea por su interés comercial o porque se encuentran enlistadas en alguna categoría de riesgo. Algunos de los trabajos de propagación de orquídeas como el realizado por Oliva *et al.*, (1995) con *Spathoglottis*, una orquídea terrestre, con diferentes medios, mencionan que las plantas obtenidas se transfirieron a tierra para la inducción de protocormos.

En 1994 Fay reporta que la especie *Dendrobium spectatissimum* fue propagada para distribuirla en Jardines Botánicos o para reintroducirlas a su medio natural, obteniendo cantidades masivas con éxito de sobrevivencia en condiciones de invernadero.

Teng *et al.* (1997) trabajaron con *Spathoglottis alicata* en medio MS al MS 50% más tiamina-HCl, piridoxina-HCl, ácido nicotínico 0.5 mg/l, inositol 100 mg/l, glicina 2 mg/l, sacarosa 3%, carbón 0.2%. ANA (0.54, 2.69, 5.37, 10.74 μ M y BA (0.44, 2.22, 4.44, 8.88 μ M), con el objetivo de micropropagarla a partir de nodos y hojas de plántulas cultivadas *in vitro*.

Murthy y Pyati (2001) reportaron la propagación de orquídeas con bajos niveles de germinación de forma natural como la especie *Aerides maculosum*, cultivada en medio MS más 2,4-D, ANA, BA y K (0.5 – 5.0 mgL⁻¹), obteniendo como resultado que los explantes foliares son una alternativa efectiva en la propagación de brotes

meristemáticos de orquídeas, siendo de fácil obtención y sin sacrificios de la planta madre.

En el 2000, Torres y Mogollón trabajaron con *Cattleya mossiae* para inducir la ramificación foliar de tallos cultivadas en medio MS modificado por Huang con un mg/L de BA y 1.0 o 3.3 $\mu\text{M/L}$ de Tidiazuron (TDZ), detectando un efecto acumulativo y residual de TDZ sobre la multiplicación de los brotes, aplicaciones mayores de 1 $\mu\text{M/L}$ inhibían el crecimiento de brotes y por otro lado no detectaron diferencias por el uso de dos concentraciones de sales inorgánicas de MS sobre el desarrollo de raíces.

Ket *et al.* (2004) micropropagaron *Anoectochilus formosanus*, orquídea en peligro de extinción, utilizando diferentes medios de cultivo: MS adicionado con 0.5 mg dm^{-3} de BA, 0.7% de agar y 3% de sacarosa, MS, KC y H3 y para la multiplicación y crecimiento de brotes en medio H3 con BA (0.1, 0.5, 1, 2 y 3 mg dm^{-3}), TDZ (0.1, 0.5, 1, 2 y 3 mg dm^{-3}), Kinetina (0.1, 0.5, 1, 2 y 3 mg dm^{-3}), sacarosa (1, 2, 3, 5 y 7%) y carbón activado (0, 0.5, 1.3 y 5, 0.1, 0.5, 1, 2 y 3 mg dm^{-3}); dependiendo del experimento. Concluyeron que el cultivo de brotes es más exitoso con medio MS y H3 que con KC y las concentraciones óptimas para aumentar el desarrollo de brotes por explante son TDZ (1 – 2 mg dm^{-3}) o BA (1 mg dm^{-3}).

Shimura y Koda (2004) micropropagaron *Cypripedium macranthos* var. *rebunenses* a través de protocormos derivados del cultivo de semillas maduras en medio basado en tres tipos de medio BM_1 , $\frac{1}{4}$ MS y HP, obteniendo que el mejor

método para la micropropagación fue HP con 1 μM de ANA y BA, debido a la rápida germinación de semillas.

Min-Wha *et al.* (2005) utilizaron al género *Doritaenopsis* en un medio de cultivo consistente en una solución de nutrientes de $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$, P, K, Ca y Mg; 8.25, 0.50, 3.75, 6.25, 5.00 y 2.50 mg l^{-1} ; con micronutrientes Fe, Mn, ZN, B, Cu y Mo; 0.45, 0.55, 0.26, 0.22, 0.03 y 0.03 mg l^{-1} , respectivamente, con la finalidad de comparar la asimilación de CO_2 , la conductancia estomática, la transpiración, la formación de cera en las hojas, la concentración de clorofila, la actividad de las células en la raíz y el desarrollo de velamen en la raíz durante la aclimatización en invernadero con diferentes niveles de densidad del flujo de fotones por un periodo de 4 meses, obteniendo como resultado que con bajos niveles de luz se registró mayor peso seco en brotes y raíz incrementando los rangos de sobrevivencia de las plantas durante la aclimatización; con poca luz o niveles intermedios, incrementó la clorofila a, b y total y los carotenoides; además demostraron que la intensidad luminosa sí tiene influencia en el intercambio de gases y que la asimilación de CO_2 en plantas tratadas con niveles altos de luz aumenta al igual que la conductancia de los estomas.

Flores-Escobar *et al.* (2008), propagaron *in vitro* *Oncidium stramineum* con el objetivo de determinar cuál era el medio más efectivo para su propagación; la germinación la realizaron en medio de cultivo MS, mientras que para el desarrollo de las plántulas se probaron los medios MS (T_1), MS suplementados con extractos orgánicos, agua de coco, peptona y carbón activado (T_2) y otro con MS con los

mismos ingredientes más polivinil pirrolidona (T₃). El porcentaje de germinación que obtuvieron fue de 47.69% y con respecto al desarrollo de las plantas, el tratamiento T₃ resultó más efectivo ya que mejoró el tamaño de las hojas y la altura de las plantas.

Ávila *et al.* (2009), realizaron estudios con *Laelia speciosa* con la finalidad de determinar el efecto de varios componentes del medio de cultivo, la maduración de la cápsula, la iluminación sobre la germinación y desarrollo de *L. speciosa in vitro* y evaluar la aclimatización de plántulas en condiciones de invernadero; respecto a este último punto se utilizaron diferentes sustratos obteniendo mayor frecuencia de sobrevivencia con sustrato comercial que con sustratos compuestos de tezontle-tierra de encino o tezontle-vermiculita, sin embargo, plántulas de 5 centímetros de longitud transplantadas en sustrato de tezontle y tierra de encino tuvo mayor éxito de sobrevivencia.

Sarabia *et al.* (2010) reportaron el crecimiento y diferenciación de callo derivado de explantes de hojas de *L. speciosa* que fueron cultivados en medio de MS con 30 g l⁻¹ de sacarosa y cinco concentraciones (0.0, 0.25, 0.5, 1.0, y 2.5 g l⁻¹) de ANA en combinación con BA (0.0, 0.25, 0.5, 1.0, y 2.5 g l⁻¹). Los explantes de hojas de plántulas cultivadas *in vitro* fueron efectivos para la formación de callo en el medio MS suplementado con 2.5 mg l⁻¹ BA, mientras que explantes de hojas maduras no respondieron. El diámetro del callo en promedio por explante de hoja fue de 1.25 cm después de ocho semanas de cultivo. El mejor desarrollo de estructuras parecidas a protocormos (PLBs) se reportó en el medio MS suplementado con 2.5

mg l⁻¹ ANA y 1 mg l⁻¹ BA. La formación de plántulas se logró exitosamente en MS suplementado con 0.5 mg l⁻¹ de ANA y 0.1 mg l⁻¹ de GA3. Dichas plántulas fueron aclimatadas exitosamente en invernadero con una tasa de supervivencia de 70%.

7. *Laelia speciosa*

El género *Laelia*, consiste en 22 especies de las cuales once se encuentran en México (*L. albida*, *L. anceps*, *L. aurea*, *L. autumnalis*, *L. bancalari*, *L. eyermaniana*, *L. furfuracea*, *L. gouldiana*, *L. rubescens*, *L. speciosa* y *L. superbiens*) y se encuentra en una gran variedad de nichos ecológicos, ya sean terrestres o epifitas. Las distintas etnias mexicanas han cultivado tradicionalmente algunas especies debido al alto valor artesanal y religioso que les atribuyen, principalmente a las flores de las orquídeas de éste género (Santos *et al.*, 2006 y Ávila *et al.*, 2009).

La clasificación taxonómica de *Laelia speciosa* (Hágsater *et al.*, 2005) es:

REINO: Plantae

DIVISIÓN: Magnoliophyla

CLASE: Lilipsida

ORDEN: Asparagales

FAMILIA: Orchidaceae

SUBFAMILIA: Epidendroideae

TRIBU: Epidendreae

SUBTRIBU: Leeliinae

GÉNERO: *Laelia*

ESPECIE: *Laelia speciosa*

Laelia speciosa (Figuras 1, 2) es una especie endémica del centro de México considerada en peligro de extinción por la NOM-059-ECOL-2001;(SEMARNAT, 2002) esta especie requiere de 8 a 16 años para alcanzar su estado sexual reproductivo y su estado asexual es muy ineficiente (Ávila *et al.*, 2009).



Figura 1. Flor de *Laelia speciosa*

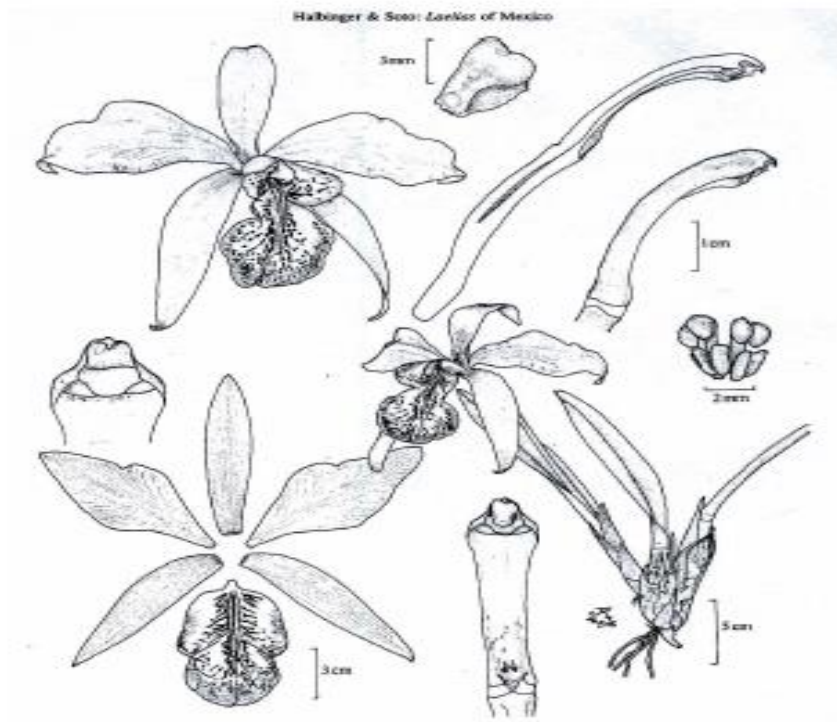


Figura 2. *Laelia speciosa* (Llave and Lex.). Schltr. M. Soto 5663. Dibujada por R. Jiménez. tomada de Halbinger F. y Soto, M. 1997.

Comúnmente se conoce como “flor de mayo”, “flor grande”, “flor de corpus”, “itzmaqua” (en Nahuatl), “tlacuxóchitl”, “deantza”, “itzámahua” (éstos últimos en Purepecha) (Ossenbach, 2009; Halbinger & Soto 1997, citados por Sarabia *et al.*, 2010). Es una hierba epífita o raramente litófito, presenta pseudobulbos subglobosos color verde claro de 3–6 cm de largo y 1.5–4 cm de grosor, de ellos se originan 1–2 hojas verde oscuro que presentan una forma lanceolada y aguda, son ligeramente carnosas. La inflorescencia de estas orquídeas es terminal, producida en el brote en desarrollo de aproximadamente 15 a 25 cm de largo. Sus flores son color rosa púrpura, en algunas ocasiones blancas o ligeramente teñidas de rosa o púrpura; el labelo es blanco, con los márgenes frecuentemente coloreados, con manchas y rayas púrpura variables, florece entre los meses de abril a junio. Los sépalos son lanceolados y agudos y los pétalos son elípticos y agudos con margen ligeramente irregular. El labelo es trilobado de 4–7 x 3.5–5 cm; lóbulos laterales oblongos, erectos, formando una garganta que rodea a la columna, el centro es frecuentemente amarillo y las laterales blancas. La columna es arqueada y el polinario cuenta con 8 polinios y sus cápsulas son elipsoidales de 6 cm de largo y 2.5 cm de grosor (Soto, 1990).

L. speciosa se encuentra principalmente en la Sierra Madre Oriental y Occidental, el Eje Volcánico Transversal y en las montañas adyacentes de la Altiplanicie Central (Aguascalientes, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas) (Ávila y Oyama 2002). Es una de las orquídeas epífitas más tolerantes a la sequía. Crece en los bosques

abiertos de encino, pero también en bosques xerófilos sobre los mezquites, yucas y cactus (Soto, 1990; Ávila y Oyama, 2007).

Ávila y Oyama en 2002, señalan que es una de las especies más hermosas del género y la orquídea silvestre más colectada en México, por su valor ornamental y cultural y que cada año se venden plantas o segmentos de éstas en las carreteras y en los mercados del sur y centro de México. Se considera que el número de flores con uno o dos pseudobulbos es de miles a cientos de miles cada temporada, ya que en la época máxima de floración, se estima que se venden alrededor de 1500 flores diarias (Soto, com. pers., Ávila y Oyama, 2002). Por otra parte, en el estado de Michoacán, por ejemplo, el uso de esta orquídea se encuentra muy relacionado con otras actividades productivas y culturales, algunas personas extraen sustancias mucilaginosas a partir de sus pseudobulbos para la elaboración de artesanías religiosas llamadas “figura de pasta de caña” (Miranda, 1997, citado por Ávila y Oyama, 2002 y Sarabia *et al.*, 2010); este mucílago de interesantes cualidades adhesivas, también era utilizado en el arte plumario prehispánico. Con este mucílago también se preparan los alfeñiques y los dulces de calaverita (Halbinger, 1993); desde la llegada de los españoles se usó en la fabricación de confites para la festividades del día de todas las almas (García y Peña, 1981 citados por Ossenbach, 2009). Además de los usos tradicionales y ornamentales de *L. speciosa*, ésta orquídea se caracteriza por presentar bajas tasas de sobrevivencia de plantas jóvenes en su ambiente natural (Hernández-Apolinar, 1992 citado por Flores, 2006).

La propagación *in vitro* de las orquídeas ha permitido la generación de plantas comerciales y para repoblar su hábitat, por lo que se considera una alternativa que podría coadyuvar en disminuir presión en las poblaciones naturales. El cultivo *in vitro* es un método para propagar especies endémicas o en peligro de extinción con fines de conservación, siendo muy particular su uso para el cultivo de orquídeas debido a la dificultad de germinar las semillas con métodos tradicionales (Ávila *et al.*, 2009).

III. JUSTIFICACIÓN

Laelia speciosa es una especie endémica de México, sujeta a protección especial debido a su sobreexplotación por la belleza de su flor que es utilizada con fines comerciales y ornamentales; su reproducción en campo es deficiente y tiene baja tasa de sobrevivencia en su ambiente natural, por lo que el cultivo *in vitro* es una estrategia para su conservación y propagación. Para tener un porcentaje de sobrevivencia alto es importante evaluar su comportamiento fisiológico en la etapa de aclimatización, por lo cual se plantearon los siguientes objetivos.

Para este proyecto específico se considera trabajar *L. speciosa* ya que además de la importancia y problemática que presenta, se encuentra en la Reserva de la Biosfera de la Barranca de Metztitlan dentro del Estado de Hidalgo, por lo que es necesario encontrar soluciones para prevenir la extinción de ésta especie.

IV. OBJETIVOS

1. Objetivo General

Evaluar algunos parámetros fisiológicos de plántulas germinadas *in vitro* de *Laelia speciosa* (Orchidaceae) en diferentes sistemas de ventilación para determinar si mejoran su desarrollo en la etapa de aclimatización.

2. Objetivos Específicos

- Cuantificar el peso de las plántulas desarrolladas en los diferentes sistemas.
- Evaluar la frecuencia estomática de las plántulas procedentes de los diferentes sistemas de ventilación.
- Realizar la extracción y cuantificación de pigmentos fotosintéticos de plántulas procedentes de los diferentes sistemas de ventilación.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Germinación *in vitro* de semillas de *L. speciosa*

Semillas de *L. speciosa* procedentes de una cápsula colectada en la Reserva de Biosfera Barranca de Metztlán, se colocaron en paquetes de papel filtro y se desinfectaron con una solución de cloro comercial (6% de cloro activo) al 15% (v/v) durante 15 minutos, posteriormente se realizaron 3 enjuagues con agua destilada. Las semillas se sembraron en cajas de petri de 150 x 100 mm con 15 ml de medio Knudson C (KC), adicionado con sacarosa 20 g/L agar Bioxón®, 8 g/L, carbón activado 2 g/L y un pH de 5 (Anexo 1).

Se incubaron a una temperatura de 26 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 16/8 e intensidad luminosa de $60-70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Se realizaron varios subcultivos para que las plántulas alcanzaran la talla adecuada.

2. Establecimiento de los sistemas de ventilación

Se establecieron 5 sistemas de ventilación. Que consistieron en frascos de vidrio de alimento infantil Gerber® de 110 ml de capacidad a los cuales se les pusieron tapas de polipropileno (Figura 3), que fueron previamente perforadas en el centro con un orificio de 8 mm de diámetro



Figura 3.- Frasco de vidrio con tapa de polipropileno y sistema de ventilación en la tapa

El orificio fue cubierto por la parte interna y externa del mismo con cinta micropore 3M® con una a varias

capas, dependiendo del número de capas y posición se designó una letra a cada sistema de ventilación, (Figura 4).

Los sistemas consistieron en:

Sistema A: la tapa de polipropileno sin ninguna perforación, por lo tanto fue el grupo control.

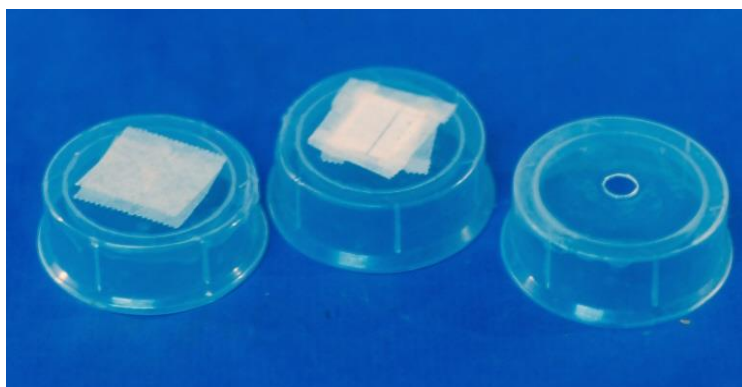


Figura 4 . Tapas de polipropileno con perforación y capas de cinta micropore 3M ®

Sistema B: tapa de polipropileno perforada a la cual se le colocó una capa de cinta micropore por dentro y una por fuera

Sistema C: tapa de polipropileno perforada con una capa de cinta por dentro y dos capas por fuera.

Sistema D: tapa perforada de polipropileno con dos capas de cinta por dentro y dos por fuera.

Sistema E: filtro comercial Sun Biofilter (Sigma-Aldrich), las cuales son tapas transparentes de polipropileno suave y flexible, con un filtro en la parte central con un diámetro de 8 mm y poro de 0.02 μm (Figura 5).

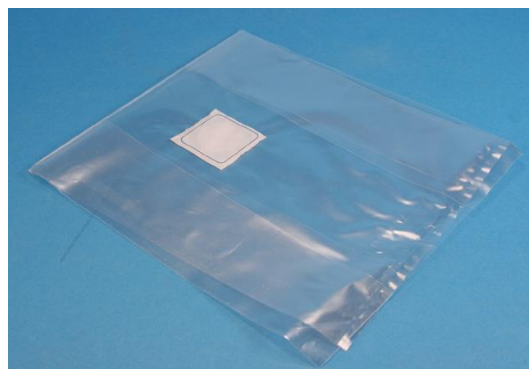


Figura 5. Sun Biofilter de Sigma-Aldrich

Ya establecidos los sistemas de ventilación se les adicionó a cada frasco 30 ml de medio de cultivo Knudson C, se les colocaron las tapas correspondientes de cada sistema y se esterilizaron en autoclave (15 minutos a 121°C, 1.5 Kg/cm³). Los frascos se colocaron en al cuarto de incubación a 26± 2°C, fotoperiodo de 16/8 e intensidad luminosa de 60-70 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Para evaluar la perdida de peso, durante 68 días se procedió a pesar con una balanza analítica cada frasco con la finalidad de medir la pérdida de peso del medio de cultivo y por ende su deshidratación, así mismo se evaluó si los sistemas eran eficientes y no se contaminaban realizando pruebas estadísticas (ANOVA).

Una vez determinada la eficacia de los filtros y corroborado que los sistemas no se contaminaban, posteriormente se realizó el subcultivo de plántulas de *L. speciosa* de una talla aproximada de 1 a 1.5 cm; dentro de la campana de flujo laminar, las plantas se colocaron en cada frasco 8 plántulas y para cada sistema de ventilación se utilizaron 10 frascos.

3. Evaluaciones fisiológicas

a) Cuantificación de clorofila

Las plántulas de *Laelia speciosa* se subcultivaron en medio fresco en los diferentes sistemas y se dejaron transcurrir 2 meses para observar que no se contaminaran, ni hiperhidrataran y se realizó la primera medición (Tiempo 0), posteriormente se realizaron mediciones cada dos meses, hasta completar 8 meses. Se tomaron 4 hojas de plántulas procedentes de los diferentes sistemas de ventilación, los cuales se pesaron y se maceraron por separado en un mortero (previamente enfriado en un congelador), se adicionaron de 10 mL de acetona al 80% durante el proceso, el macerado se colocó en un vial cubierto con papel aluminio para evitar la degradación de la clorofila por la acción de la luz, posteriormente se vació en tubos Eppendorff y se centrifugó a 2000 rpm durante seis minutos.

Posteriormente se extrajo el sobrenadante y se midió la absorbancia a 663 nm, 645 nm. Se ajustó el espectrofotómetro a cero de absorbancia utilizando acetona al 80% como blanco. Se realizaron 5 lecturas, cada dos meses, para cada sistema de ventilación así como del grupo control.

Para calcular la concentración de clorofila se consideró el peso fresco del tejido y se utilizó la siguiente fórmula propuesta por Machinney en 1941 (Rodés y Collazo, 2006), modificada de acuerdo al volumen final del extracto de pigmentos a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} \text{Ca (mg L}^{-1}\text{)} &= (12.7 (A_{663}) - 2.69 (A_{645})) \\ \text{Cb (mg L}^{-1}\text{)} &= (22.9 (A_{645}) - 4.68 (A_{663})) \\ \text{C a+b (mg L}^{-1}\text{)} &= (20.2 (A_{645}) + 8.02 (A_{663})) \end{aligned}$$

b) Frecuencia estomática

En la campana de flujo laminar se sacaron 3 plántulas de *L. speciosa* de cada sistema (las plántulas contaban con un tiempo de 6 meses en cada tratamiento) y se colocaron en cajas de Petri, posteriormente y al exterior de la campana se tomaron hojas de un tamaño aproximado de 2 a 3 cm de altura y 0.3 a 0.5 cm de ancho; las hojas se cubrieron por ambos lados con una fina película de esmalte transparente para uñas con la finalidad de obtener improntas de los estomas, al secar el esmalte se retiró cuidadosamente la capa formada y se colocó en un porta y cubre objetos, los cuales se etiquetaron para identificar de que sistema provenían los improntas; de cada sistema se realizaron 5 repeticiones, es decir, se trabajó con 5 hojas de cada uno. Posteriormente se registraron imágenes de los estomas con auxilio de un microscopio óptico, en contraste de fases con objetivo 10X, para determinar la frecuencia estomática se utilizó el programa Image Tool, haciendo conteo de estomas y células epidérmicas en tres zonas de la hoja (ápice,

centro y base) y se utilizó la siguiente fórmula (Wilkinson, 1979, citado por Salas *et al.*, 2001):

$$\text{Frecuencia estomática} = \frac{\text{No. estomas}}{\text{No. estomas} + \text{No. células epidérmicas}} \times 100$$

De las 5 repeticiones se promediaron los resultados y se ejecutó la fórmula anterior.

Para ambas evaluaciones se realizó un ANOVA y comparación de medias con el análisis de Tukey, utilizando el programa SPSS Ver. II

En la figura 6 se puede observar la metodología general que se desarrolló para cumplir con los objetivos ya mencionados.

Metodología general

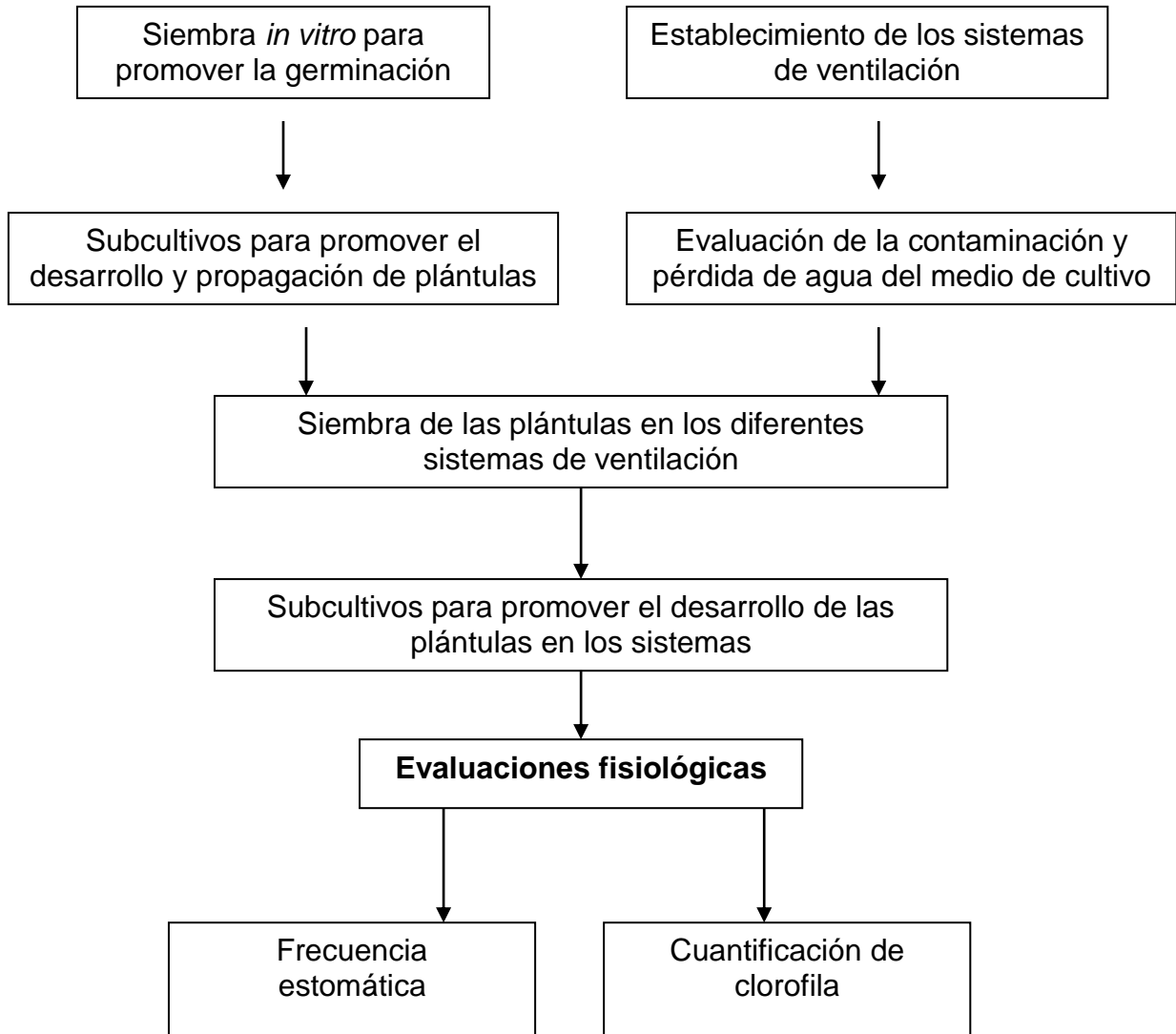


Figura 6.- Diagrama de flujo que muestra el procedimiento utilizado para evaluar algunos parámetros fisiológicos de plántulas germinadas *in vitro* de *Laelia speciosa* (Orchidaceae) en diferentes sistemas de ventilación.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Germinación *in vitro* de semillas de *L. speciosa*

La técnica de desinfección fue la adecuada ya que no se presentó contaminación, la germinación de las semillas inició a los 13 o 15 días de iniciada su siembra.

Las semillas se hidrataron y los embriones se tornaron de color verde, posteriormente, después de 22 a 25 días los protocormos dieron lugar a las plántulas, que mostraron ya sus primeras hojas a los 28 o 32 días de incubación (Fig. 7)

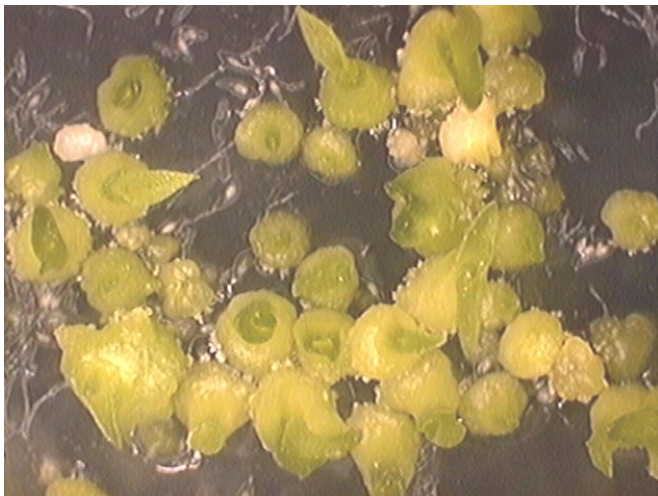


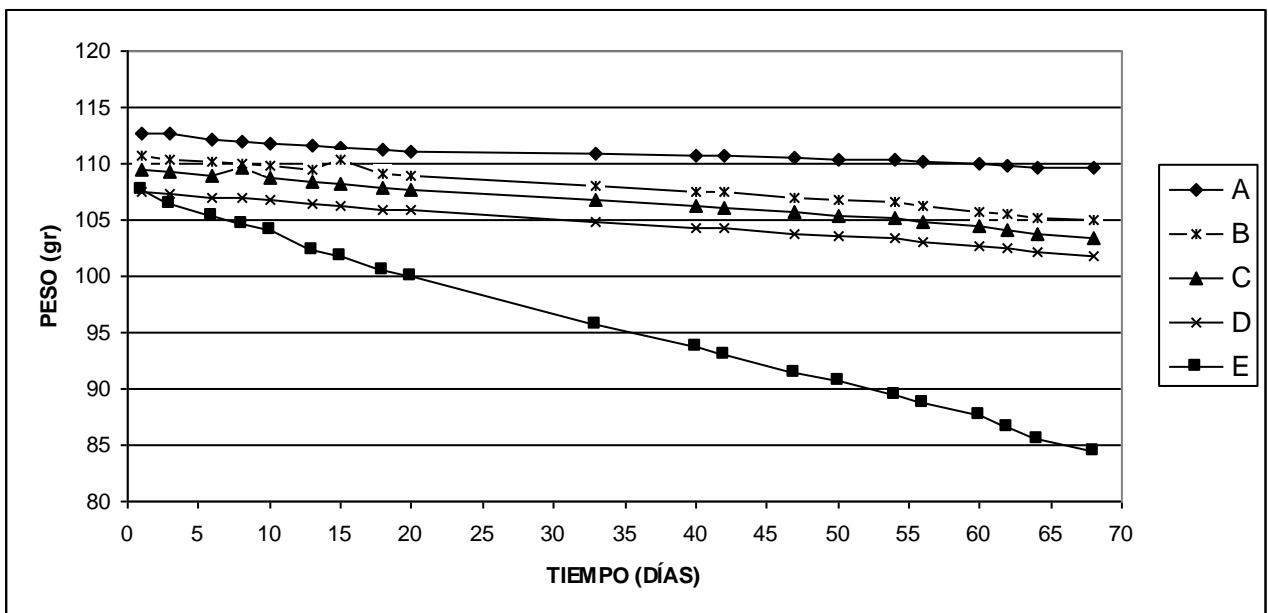
Figura 7. Plántulas de *Laelia speciosa* obtenidas a través del cultivo de semillas.

2. Evaluación de los sistemas de ventilación

a) Pérdida de peso

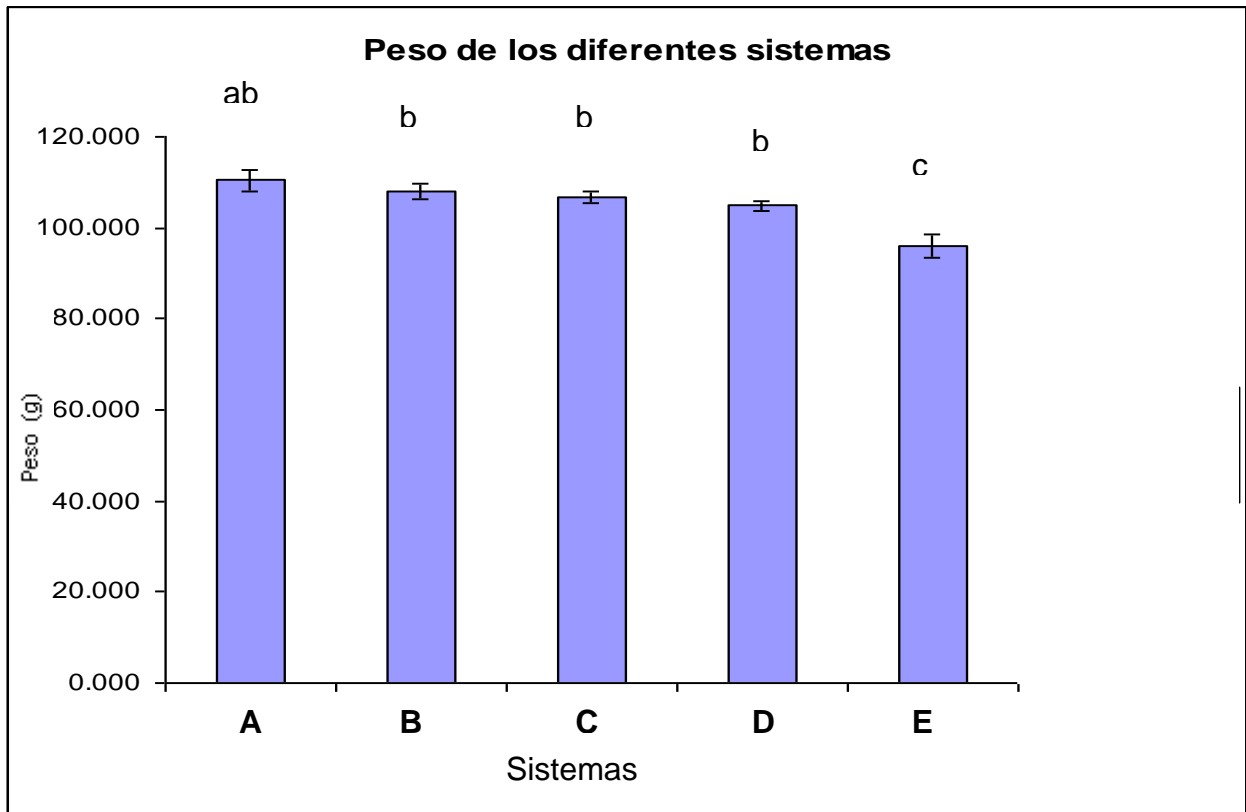
Se registró la pérdida de peso de los diferentes sistemas de ventilación establecidos durante el tiempo de la evaluación (68 días) (Grafica 1). Se observó que la deshidratación del medio en los sistemas es diferente, siendo notoria la pérdida de peso (deshidratación) en el sistema E (Biofilter). Al comparar el peso inicial con el peso final obtenido de los sistemas a lo largo del tiempo de

evaluación se encontró que en el sistema A (tapa sin perforación) la pérdida de peso fue de 2.235 g, la del sistema B de 2.648 g, del sistema C de 2.831 g, el sistema D de 2.724 g y el sistema E de 11.544 g. Lo que nos indica que a la pérdida de peso es la cantidad de agua que se evapora de los contenedores gracias a la ventilación inducida al perforar las tapas y colocar diferentes filtros que impidan que se contamine el medio de cultivo.



Grafica 1: Pérdida de peso de los sistemas de ventilación ensayados para la aclimatización de *Laelia speciosa*. A = Tapa sin perforación; B = una capa de micropore por ambos lados de la tapa; C = una capa de micropore por dentro y dos capas por fuera de la tapa; D = dos capas de micropore por ambos lados de la tapa; E = Sun Biofilter

Por medio de un ANOVA se comparó y con la prueba de Tukey el peso final de los sistemas, encontrando diferencias estadísticamente significativas ($F = 90.033$; $p = .000$), obteniendo que los Sistemas A, B, C, D, no presentan diferencias, siendo el Sistema E el único es estadísticamente diferente (Gráfica 2).



Gráfica 2. Peso final promedio después de 68 días de los frascos con los diferentes sistemas ensayados para la aclimatación de *Laelia speciosa*.

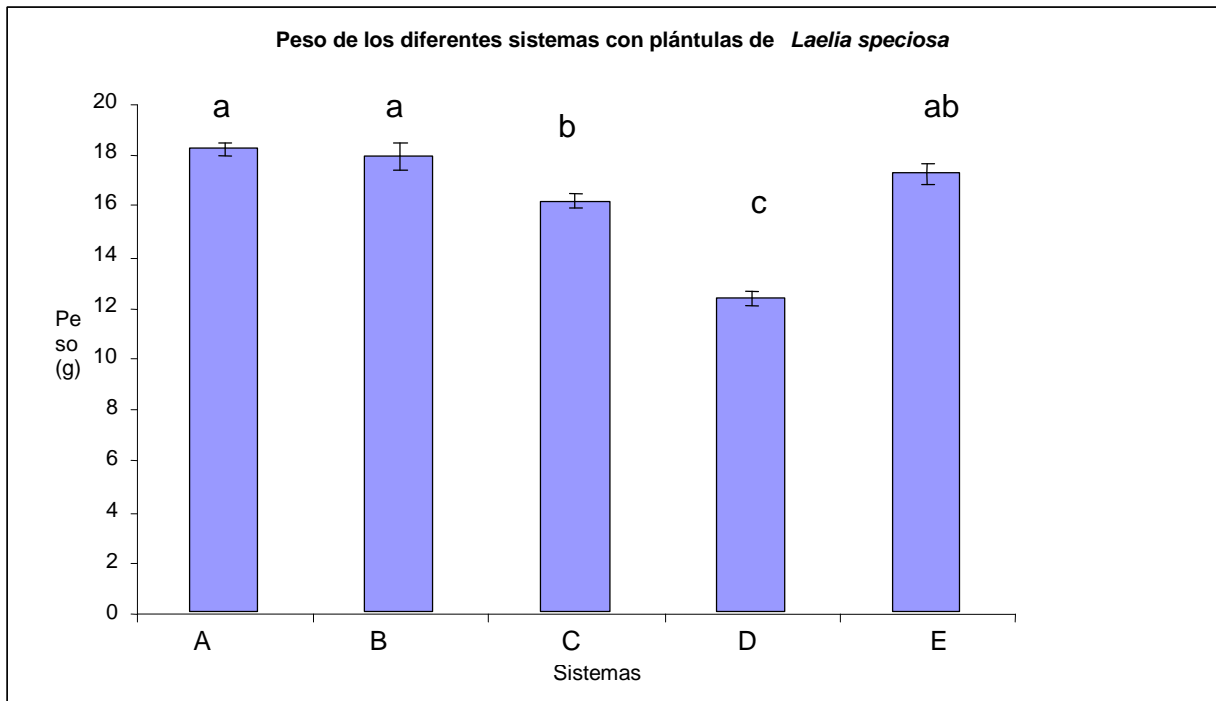
Esto indica que los Sistemas A, B, C y D se comportan de una manera similar y la pérdida de peso y por ende la de agua es menor que en el Sistema E. Desde el punto de vista de los procesos de aclimatación el Sistema E, podría ser el mejor candidato debido a que ésta pérdida gradual del agua va ocasionando que la humedad relativa del frasco vaya siendo menor, lo que permite que el material vegetal sobreviva a las condiciones *ex vitro* (Maene y Debergh, 1987; Vanderschaeghe y Debergh, 1987; citados por Buddendorf-Joosten y Woltering, 1996); así mismo se favorece que los estomas sea más funcionales y se engrose

la cutícula, características que van a permitir un mejor éxito de sobrevivencia *ex vitro*.

Se llevó a cabo la evaluación de la pérdida de peso (deshidratación) con las plantas dentro del contenedor y la cuantificación de algunas características fisiológicas. Por lo que se realizó la misma prueba pero con plantas dentro de los sistemas, con el objeto de determinar el sistema que permite el mejor desarrollo de las plantas cultivadas *in vitro*.

b) Pérdida de peso con plántulas de *Laelia speciosa*

Al evaluar la pérdida de peso de los frascos en los diferentes sistemas con las plántulas de *L. speciosa* se pudo observar un comportamiento distinto en cuando a los sistemas cuando no tienen el material vegetal. En el ANOVA y se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($F = 39.561$; $p = .000$), los Sistemas A, B y E no presentan diferencias por lo tanto la pérdida de peso (deshidratación) es muy similar entre ellos, seguidos del Sistema C, siendo el Sistema D el de mayor diferencia estadísticamente significativa y el que pierde mayor cantidad de peso (Gráfica 3). La pérdida de peso tanto del sistema como del material vegetal probablemente indican que las plantas están transpirando de una forma más intensa y al momento de transferirlas a suelo, sean las que menos posibilidades tengan de sobrevivir, porque tienen los estomas abiertos y se deshidratarían o que el contenedor con el sistema establecido permite a las plantas tener un mejor control de la transpiración de una manera gradual a lo largo del periodo de evaluación.



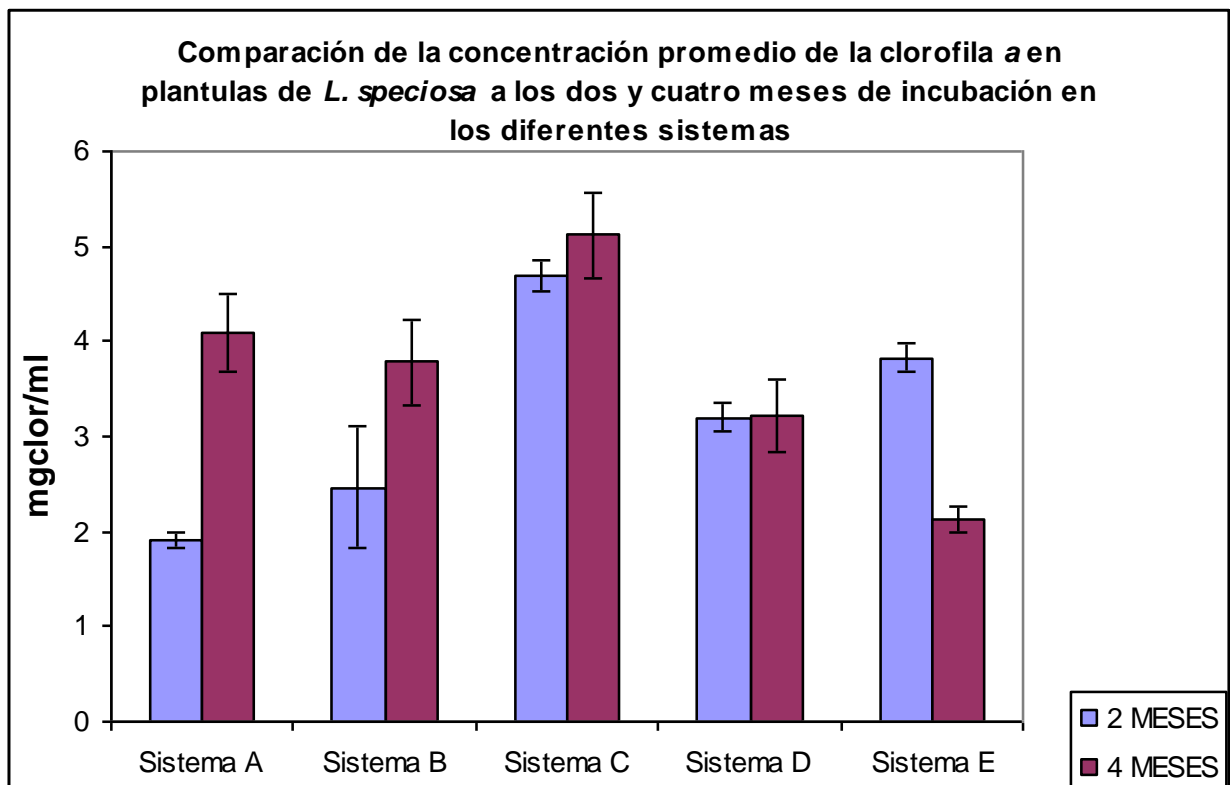
Gráfica 3. Peso final promedio después de 68 días de los frascos con los diferentes sistemas ensayados conteniendo plántulas de *Laelia speciosa*. A = Tapa sin perforación; B = una capa de micropore por ambos lados de la tapa; C = una capa de micropore por dentro y dos capas por fuera de la tapa; D = dos capas de micropore por ambos lados de la tapa; E = Sun Biofilter

3. Evaluaciones fisiológicas

a) Cuantificación de clorofila

De las evaluaciones para determinar la concentración de clorofila *a*, clorofila *b* y clorofila total de las plántulas de *L. Speciosa* a los 2, 4, 6 y 8 meses en condiciones de incubación en los diferentes sistemas y de las comparaciones entre cada uno de ellos, se obtuvo lo siguiente:

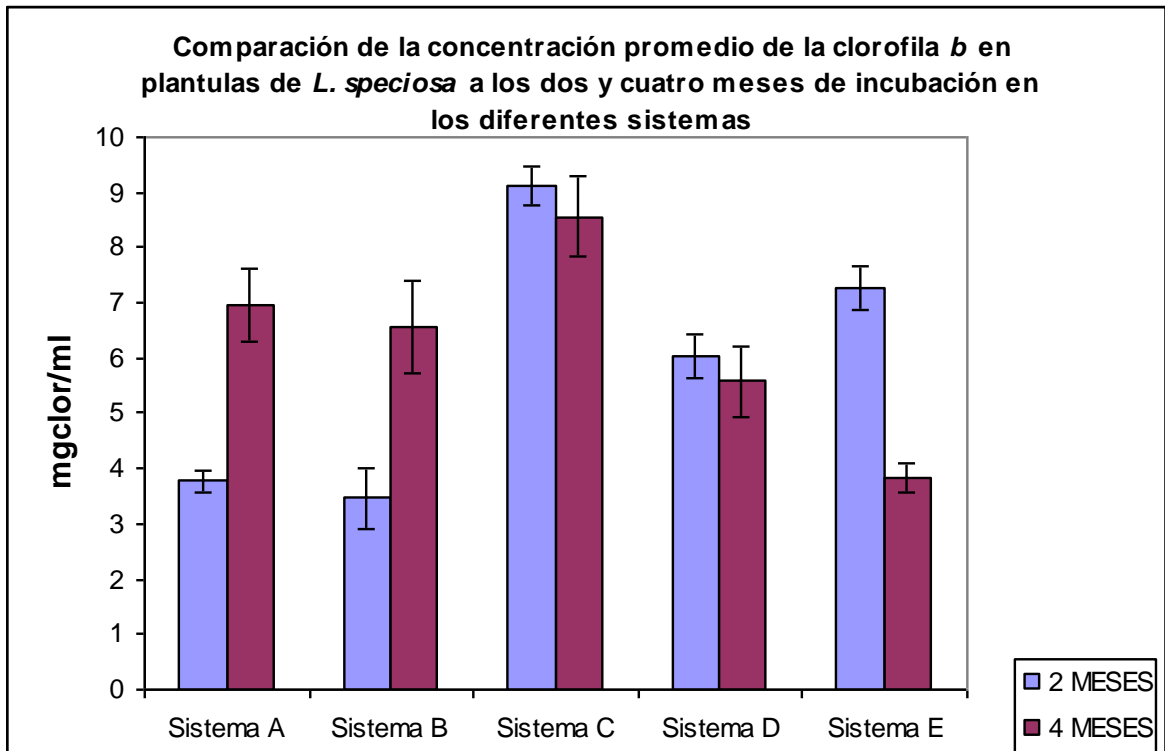
A los **dos meses** de incubación la mayor concentración de clorofila *a* y *b* se registró en el Sistema C con 4.68 mgclo/ml y 9.13 mgclo/ml respectivamente, en este mismo sistema a los cuatro meses hay un incremento en la concentración de clorofila *a*, alcanzando un valor de 5.11 mgclo/ml (Gráfica 4).



Gráfica 4: Concentración de la clorofila *a* en plántulas de *L. speciosa* a los dos y cuatro meses de cultivo *in vitro*. A = Tapa sin perforación; B = una capa de micropore por ambos lados de la tapa; C = una capa de micropore por dentro y dos capas por fuera de la tapa; D = dos capas de micropore por ambos lados de la tapa; E = Sun Biofilter

Del ANOVA obtenido en los diferentes sistemas para cada tiempo de incubación se observó que en la concentración de clorofila *a* hay diferencias estadísticamente significativas ($F= 12.182$; $p = .000$) y ($F= 8.506$; $p = .000$), a los dos y cuatro meses de incubación en el sistema C.

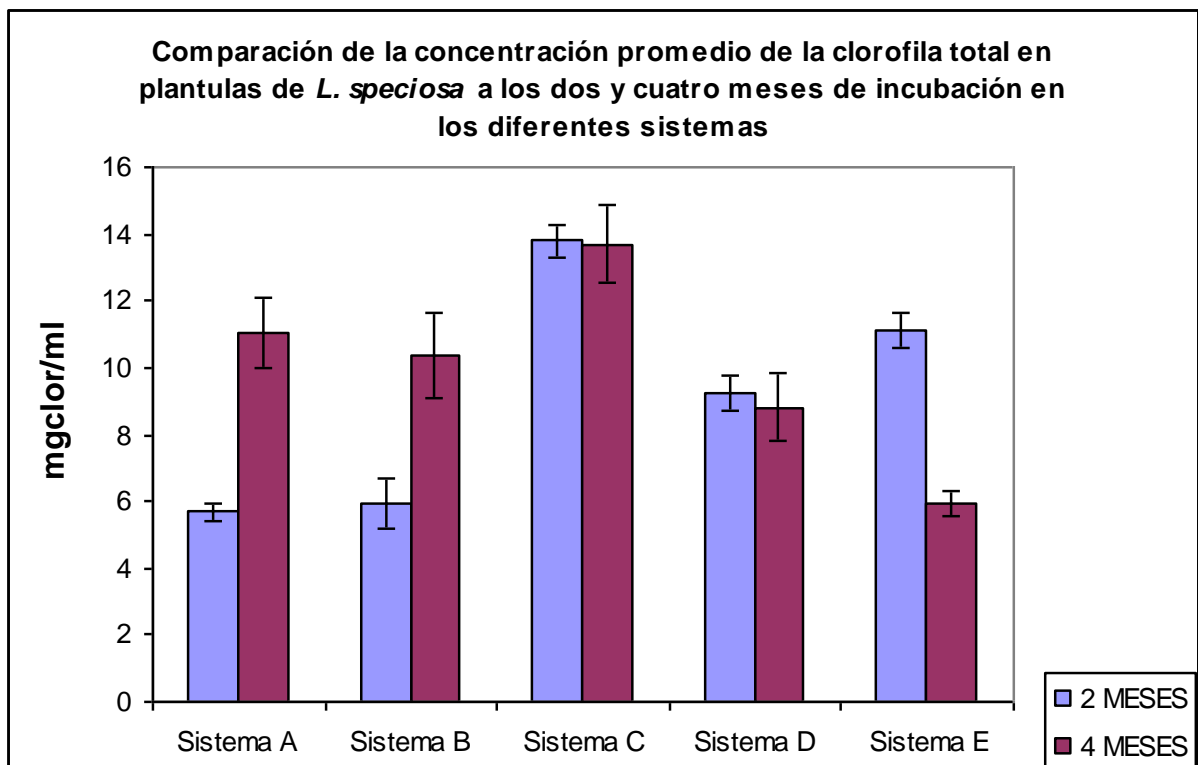
Algo similar se observó en la concentración de clorofila *b* a los **cuatro meses** de incubación, la concentración de clorofila *b* fue de 9.13 mgclo/ml a los dos meses y posteriormente decrece a los cuatro meses a 8.57 mgclo/ml. En relación al resto de los sistemas, la concentración de clorofila osciló entre los 3 y 7 mgclo/ml y a los cuatro meses en los sistemas A y B se registró un incremento del doble de la concentración, por el contrario en los sistemas D y E hubo un decremento de la concentración de clorofila *b* (Grafica 5)



Gráfica 5: Concentración de la clorofila *b* en plántulas de *L. speciosa* a los dos y cuatro meses de cultivo *in vitro* A = Tapa sin perforación; B = una capa de micropore por ambos lados de la tapa; C = una capa de micropore por dentro y dos capas por fuera de la tapa; D = dos capas de micropore por ambos lados de la tapa; E = Sun Biofilter

En este pigmento fotosintético también se observaron diferencias estadísticamente significativas a los dos y cuatro meses ($F= 41.943$; $p = .000$), ($F= 7.092$; $p = .000$) respectivamente en el sistema C.

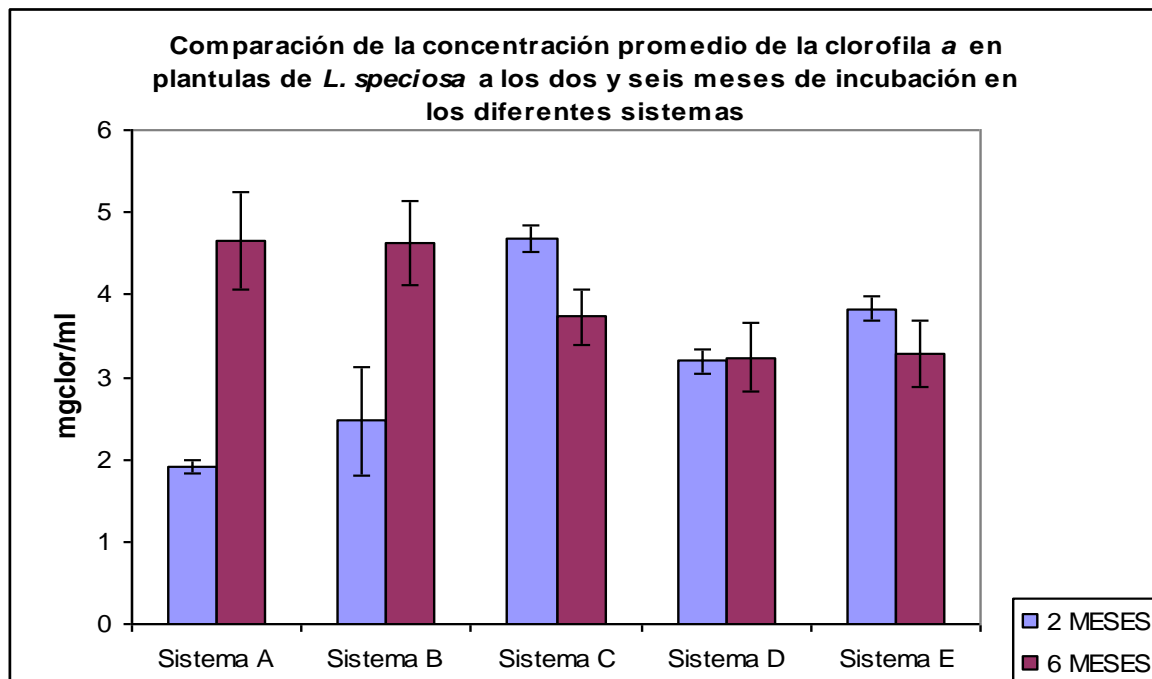
Por lo tanto la mayor concentración de clorofila total se presentó en el sistema C (Gráfica 6)



Gráfica 6: Concentración de la clorofila total en plántulas de *L. speciosa* a los dos y cuatro meses de cultivo *in vitro* A = Tapa sin perforación; B = una capa de micropore por ambos lados de la tapa; C = una capa de micropore por dentro y dos capas por fuera de la tapa; D = dos capas de micropore por ambos lados de la tapa; E = Sun Biofilter

En la clorofila total el sistema C es el que presentó diferencias estadísticamente significativas a los dos y cuatro meses ($F = 46.688$; $p = .000$); ($F= 7.669$; $p = .000$).

Al transcurrir el tiempo de incubación a **seis meses** se observó un incremento en la concentración de clorofila *a* en el sistema B de 3.785 a 4.632 mgclo/ml y en el sistema E de 2.123 a 3.279 mgclo/ml y por el contrario el sistema C mostró un decremento de 5.115 mgclo/ml a 3.721 mgclo/ml. En la clorofila *b* es mayor el incremento, en los sistemas A, B y E de 6.9568 a 8.0340 mgclo/ml (sistema A); de 6.5766 a 7.934 mgclo/ml (sistema B); de 3.827 a 5.410 mgclo/ml (sistema E), en el sistema C se observó un decremento de 8.567 a 6.322 mgclo/ml y el sistema D no muestra cambios (Grafica 7).



Gráfica 7: Concentración de la clorofila *a* en plántulas de *L. speciosa* a los dos y seis meses de cultivo *in vitro* A = Tapa sin perforación; B = una capa de micropore por ambos lados de la tapa; C = una capa de micropore por dentro y dos capas por fuera de la tapa; D = dos capas de micropore por ambos lados de la tapa; E = Sun Biofilter.

En los tiempos de seis y ocho meses de cada concentración de clorofila y sistema no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Lo anterior indica que al parecer el sistema C les permite a las plantas producir pigmentos fotosintéticos, el incremento en la concentración de la clorofila es originado por un crecimiento fotoautotrófico (Pospíšilová, 1998), así mismo se ha reportado que bajas concentraciones de clorofila no permiten la sobrevivencia de plantas de aguacate, roble y fresa al ser transferidas a condiciones *ex vitro* (Premkumar *et al.*, 2001).

Los resultados mostraron que probablemente el sistema E al perder más agua ocasiona que las plantas cultivadas no se desarrollen óptimamente presentando bajos niveles de clorofila, y sólo regeneran de 2 a 4 brotes promedio; Majada *et al.* (2000) reportaron una reducción en la proliferación o crecimiento de los brotes de *Dianthus caryophyllus* en filtros comerciales (Sigma). Por el contrario en plántulas provenientes de los sistemas que no pierden agua rápidamente (A, B y D) la concentración de clorofila es favorable y su multiplicación va de 4 a 10 brotes, y el sistema C en el que la pérdida de agua es intermedia, lo que indica que hay una mejor ventilación, y por lo tanto genera la suficiente humedad relativa dentro del contenedor, permite que las plántulas tengan un mejor funcionamiento de los estomas y un mayor engrosamiento de la cutícula (Short *et al.*, 1987; y Wardle *et al.*, 1983; citados por Roberts *et al.*, 1990) incrementando su sobrevivencia *ex vitro* (Maene y Debergh, 1987; Vanderschaeghe y Debergh, 1987; citados por Buddendorf-Joosten y Woltering, 1996).

b) Características de los estomas

Se analizaron las improntas de la zona central o media de la hoja y se observó que los estomas en el sistema A, D y E no estaban completamente formados (Figura 8a), no se definen claramente las células oclusivas o están incipientes y de distribución azarosa (Figura 8b), las células de la epidermis no están definidas, pueden ser hexagonales, poligonales, irregulares, pequeñas, poco alargadas y numerosas (Figura 8c). Las condiciones *in vitro* provocan que la tasa de transpiración sea baja debido a que no hay un flujo gaseoso dentro del contenedor por lo que el aparato estomático no se desarrolla (Torres *et al.*, 2006)

En los sistemas C y D, se observaron estomas del tipo tetracítico con las células oclusivas más definidas, turgentes (Figura 8d), con el poro abierto y distribuidas de manera azarosa (Figura 8e). Esto concuerda con lo reportado por Torres *et al.* (2006) que realizaron el estudio de la anatomía de la epidermis de *Cattleya jenmanii* propagadas *in vitro*, en este trabajo también señalan que los estomas son de tipo tetracítico.

Las células de la epidermis son alargadas poligonales se ven bien definidas y con relieve, lo que probablemente indique cierto grosor de la cutícula (Figura 8d y 8e). Se ha reportado que en clavel propagado *in vitro* presenta anomalías anatómicas, entre ellas la reducción del grosor de la pared celular (Majada *et al.*, 2000; Kevers y Gaspar, 1986; Majada *et al.*, 2002, citados por Torres *et al.*, 2006).

Torres *et al.* (2006) señalan que un mejor desarrollo de los estomas y de las células epidérmicas podría interpretarse como un mayor control del balance hídrico.

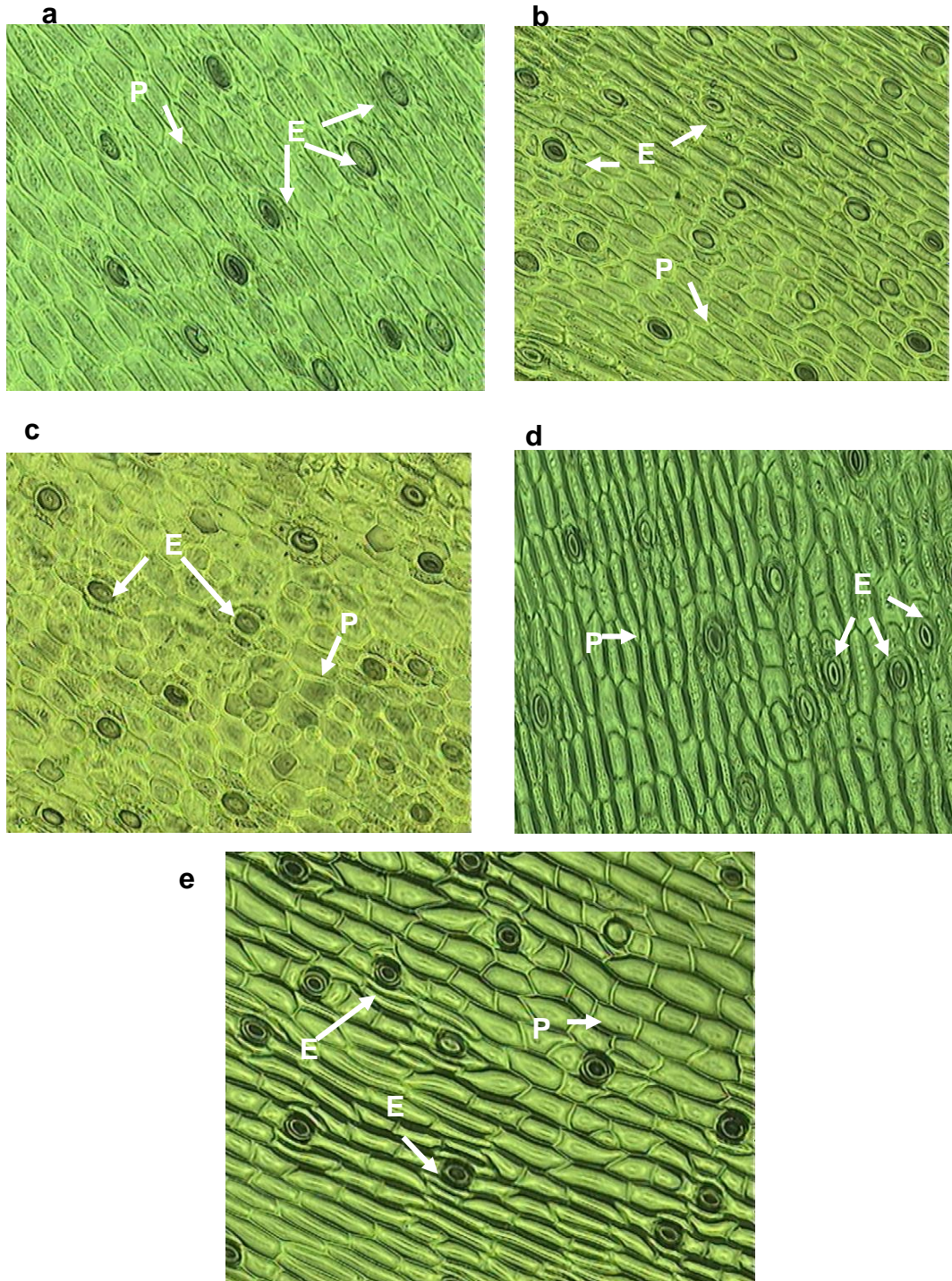


Figura 8. Vista frontal de las improntas de la epidermis de hojas cultivadas *in vitro* de *Laelia speciosa* en los diferentes sistemas a: Sistema A (Tapa sin perforación); b: Sistema D (dos capas de micropore ambos lados de la tapa); c: Sistema E (Sun Biofilter); d: Sistema C (una capa de micropore por dentro y dos capas por fuera de la tapa); e: Sistema D (dos capas de micropore por ambos lados de la tapa). E = estoma; P = pared celular. Aumento 10X

Lo anterior permite señalar que durante el proceso de aclimatización *in vitro* los sistemas C y D, son los que promueven el mejor desarrollo de los estomas y el engrosamiento de las células epidérmicas, lo que le permitiría a las plántulas de *L. speciosa* tener un mayor éxito de sobrevivencia *ex vitro*.

c) Frecuencia estomática

La frecuencia estomática de las tres zonas de las hojas en los cinco sistemas fueron muy similares (Tabla 2) y no presentaron diferencias significativas. Lo que indica que no hay un efecto de los sistemas en la frecuencia estomática de las plántulas de *L. speciosa* cultivadas *in vitro*.

Tabla 2: Frecuencia estomática de hojas de *L. speciosa* cultivadas *in vitro* en los diferentes sistemas de ventilación, registrada a los 6 meses de que las plántulas se sometieron al tratamiento. A = Tapa sin perforación; B = una capa de micropore por ambos lados de la tapa; C = una capa de micropore por dentro y dos capas por fuera de la tapa; D = dos capas de micropore por ambos lados de la tapa; E = Sun Biofilter

Sistema	Apical	Media	Basal
A	8.31	6.82	4.97
B	8.95	5.43	5.07
C	8.77	7.088	5.54
D	7.69	7.19	3.97
E	5.7	7.8	6.31

Existen reportes sobre el efecto de reguladores del crecimiento en el índice estomático, Proietti *et al.* (1997) (citado por Torres y Mogollón, 2002) reportaron

que no se observó un efecto en la densidad e índice estomático en plantas *ex vitro* de *Castanea sativa* por el Paclobutrazol (PBZ) y Blanco *et al.* (1997) (citado por Torres y Mogollón, 2002) reportaron, en hojas de durazno en condiciones *ex vitro*, un incremento en la frecuencia estomática al aumentar la concentración de PBZ. En este caso, la plántulas de *L. speciosa* no recibieron ningún tratamiento con fitohormonas, probablemente si se le aplicaran, se observarían diferencias entre los sistemas utilizados y el sistema de ventilación empleado.

VII. CONCLUSIONES

- Es posible utilizar cinta microporo para la aclimatización de plántulas cultivadas *in vitro* debido a que es más económico que adquirir los filtros biológicos, no se contamina el material y permite que haya una disminución gradual de la humedad relativa dentro del contenedor.
- El sistema E (filtro comercial) es el menos favorable para la aclimatización *in vitro* de las plántulas de *L. speciosa* ya que al deshidratarse el medio de cultivo más rápido requiere mayor manipulación de las plántulas al estar transfiriéndolas continuamente a medio de cultivo nuevo, no se promueve la propagación y las plantas probablemente no han desarrollado su sistema fotosintético adecuado y las posibilidades de sobrevivir *ex vitro* no serían favorables.

- Se sugiere trabajar con el sistema C (tapa de propileno perforada con una capa de cinta micropore por dentro y dos capas por fuera) considerando que favoreció un incremento en la concentración de clorofila *a* y *b* en los dos y cuatro meses de incubación; lo que le permitiría a las plántulas tener posibilidades de sobrevivir *ex vitro*. Debido a que después de ese tiempo el contenido de la clorofila va disminuyendo, se propone que a partir del cuarto mes de tratamiento se inicien algunos cambios en las variables tales como intensidad lumínica o reducir la concentración de nutrientes y sacarosa en el medio de cultivo.
- La frecuencia estomática no muestra cambios en los diferentes sistemas, pero sí en la morfología de los estomas y la superficie de la epidermis generando estomas mejor desarrollados y mayor grosor de la cutícula en las plántulas provenientes de los sistemas C y D (tapa de propileno perforada con dos capas de cinta micropore por dentro y dos capas por fuera, respectivamente).
- Finalmente se considera que el sistema de ventilación C es el que podría mejorar las condiciones de aclimatización *in vitro* de las plántulas de *L. speciosa* debido a que la pérdida de agua del sistema con las plántulas no es de manera abrupta sino gradual, permitiéndole a las plántulas generar clorofila y desarrollar sus estomas y las células de la epidermis con mejores características anatómicas y fisiológicas favorables para su sobrevivencia *ex vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre-León E (2005). Some considerations of orchid conservation in Mexico. *Orchid Conservation New*. Pp 11-13.
- Ávila DI y K Oyama (2002). Manejo sustentable de *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *Biodiversitas* Núm. 43; Año 6.
- Ávila DI y R Salgado-Garciglia (2006). Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Biológicas* No. 8 (pp. 138-149). Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo.
- Ávila DI y K Oyama (2007). Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 94 (2): 184-193.
- Ávila DI, K Oyama, CA Gómez y R Salgado-Garciglia (2009). *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. *Plant Cell Tiss, Organ Cult* 99:335-343.
- Arditti J y AD Krikorian (1996). Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators. *Botanical Journal of the Linnean Society* (1996), 122: 183–241. Department of Developmental and Cell Biology, University of California, Irvine, CA 92697-2300, U.S.A.
- Bidwell R. (1979). *Fisiología vegetal*. Ed. AGT, México.
- Buddendorf-Joosten JMC y EJ Woltering (1996). Controlling the gaseous composition of a flow system and effects of the different gaseous components on *in vitro* growth of potato plantlets. *Scientia Horticulturae* 65: 11-23.
- Collin HA y S Edwards (1988). *Plant Cell Culture* (pp. 121, 122). Springer, New York, EUA.
- Debergh PC y PE Read (1991). Micropropagation. En: Debergh PC y RH Zimmerman (eds.). *Micropropagation*. Kluwer Academia Publisher. Netherlands. 1-13.
- Eccardi, F. y R. Becerra (2003). Las orquídeas en la CITES, entrevista a Eric Hágsater. *CONABIO. Biodiversitas* 49:12-15.
- Fay MF (1994). In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation?, *Biodiversity and Conservation* 3, 176-183.
- Flores-Escobar G, JP Legaria-Solano, I Gil-Vásquez y MT Colinas-León (2008). Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. una orquídea amenazada y endémica de México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14(3): 347-353.
- Flores MC (2006). Patrón de distribución espacial y dinámica de *Oncidium crista galli*, una especie de orquídea epífita de Chiapas. Tesis de Maestría. IPN 1-49.

- George EF, MA Hall y GJ De Klerk (2008). Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition, Springer. Cap 1, Cap 2 y Cap 13.
- Gerlach G (2003). La Subtribu Sanhopeinae: Sus notables mecanismos de polinización, la química de sus aromas florales e implicaciones en sistemática y taxonomía. Lankesteriana 7: 104-106.
- Halbinger F (1993). Laelias de México. AMO México pp 71. Ed. Miguel Soto.
- Halbinger F y M Soto(1997). Laelias of Mexico. Herbario AMO, México D.F.
- Hágsater E, MA Soto Arenas, GA Salazar Chávez, R Jiménez Machorro, MA López Rosas y L Dressler (2005). Las Orquídeas de México. Instituto Chinoín, México.
- Hernández BE (1994). Técnicas integradas o técnicas ex situ-in situ. Una estrategia para Andalucía. En: Hernández BE y MM Clemente (eds.). Protección de la flora en Andalucía. Junta de Andalucía. Consejería de Cultura y Medio Ambiente. Agencia del Medio Ambiente, Andalucía, España, 159-166.
- Kadlecek P, I Tichá, D Haisel, V Capkova y C Schafer (2001). Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. Plant Science 161: 695-701.
- Kaiser WM (1987). Effects of water deficit on photosynthetic capacity. Physiologia Plantarum 71: 142-149. Copenhagen.
- Ket NV, EJ Hahn, SY Park, D Chakrabarty y KY Paek (2004). Micropropagation of an endangered orchid *Anoectochilus formosanus*. Biologia plantarum 48 (3):339-344.
- Kevers C, T Franck, RJ Strasser, J Dommes y T Gaspar (2004). Hyperhydricity of micropropagated shorts: a typically stress-induced change of physiological state. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 77: 181-191.
- Knudson L. (1946). A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. Am. Orchid Soc. Bull. 15:214-217.
- Majada JP, F Tadeo, MA Fal y R Sánchez-Tamés (2000). Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 63: 207-214.
- Mansfield T.A. (1994). Some aspects of stomatal physiology relevant to plants cultured in vitro. Physiology, Growth and Development of plants in culture. 120-131.
- Martínez R (2007). Evaluación fisiológica de brotes regenerados *in vitro* de *Echinocactus grusonii* Hildmann (Cactaceae). Especie amenazada de extinción. Tesis Facultad de Ciencias UNAM. 10-26.
- Mills D y M Tal (2004). The effect of ventilation on *in vitro* response of seedlings of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt stress. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 78: 209-216.

- Min-Wha J, BA Mohammad, H Eun-Joo, P Kee-Yoeup (2005). Effects of photon flux density on the morphology, photosynthesis and growth of a CAM orchid, *Doritaenopsis* during post-micropropagations acclimatization. *Plant Growth Regulation* 45: 139-147.
- Mullet JE y MS Whitsiit (1996). Plant cellular responses to water deficit. *Plant Growth Regulation* 20: 119-124.
- Murphy KP, JM Santamaría, WJ Davies y PJ Lumsden (1998). Ventilation of culture vessels. I. Increased growth *in vitro* and survival *ex vitro* of Delphinium. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 73 (6):725-729.
- Murthy HN y AN Pyati (2001). Micropropagation of *Aerides maculosum* Lindl. (Orchidaceae). *In vitro Cell. De. Biol. Plant* 37: 223-226. Department of Botany, Karnatak University, India.
- Oliva JS, MG Torres y JS Pedrosa (1985). Propagación acelerada de plantas ornamentales por métodos de cultivo de tejido. *Interferón y Biotecnología*, Vol. 2, No. 3, 213-219.
- Ossenbach C, J Arce y J Warner (2007). Almacenamiento de semillas de diferentes especies de orquídeas para su conservación en un banco de Germoplasma. I. Maduración, viabilidad y longevidad de semillas. *Earth, Tierra Tropical* 3 (1): 37-45.
- Ossenbach C. (2009). Orchids and Orchidology in Central America. 500 years of history. *Lankesteriana* 9(1-2): 1-268.
- Pan MJ y J Staden (1998). The use of charcoal in *in vitro* culture – A review. *Plant Growth Regulation* 26: 155-163.
- Pérez-Molphe-Balch E, R Ramírez-Malagón, HG Núñez-Palenius y N Ochoa-Alejo (1999). Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Ags, México. 179 p.
- Pierik R (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores, Mundi-Prensa, España. 326 p
- Pospíšilová J, I Tichá, P Kadlecek, D Haisel y S Plzakova (1999). Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biología Plantarum* 42 (4): 481-497.
- Preece JE y EG Sutter (1991). Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. PC Debergh y Zimmerman. *Micropropagation* 71-93. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- Premkumar A, JA Mercado y MA Quesada (2001). Effects of *in vitro* tissue culture conditions and acclimatization on the contents of Rubisco, leaf soluble proteins, photosynthetic pigments and C/N ratio. *Journal of Plant Physiology* 158:835-840.
- Ramírez, J. (1996). Orquídeas de México. CONABIO. *Biodiversitas* 5:1-5.
- Razdan MK (2003). Introduction to plant tissue culture (pp 233, 243, 244). Science, Enfield, New Hampshire.

- Roberts AV, EF Smith y J Mottley (1990). The preparation of Micropropagated Plantlets for Transfer to soil Without Acclimatization (pp. 227-236). En: Pollard JF y Walker JM (eds.). Methods in Molecular Biology. Vol. 6. Plant Cell and Tissue Culture. Humana Press, New Jersey, EUA.
- Rodés GR y Collazo OM (2006), Manual de prácticas de fotosíntesis. Las prensas de Ciencias. UNAM. México
- Rojas-Aréchiga M y C Vázquez-Yanes (2000). Cactus seed germination: a review. Journal of Arid Environments 41: 85-104.
- Rodríguez AM (1999). Los jardines botánicos de México: análisis y perspectivas. CONABIO. Biodiversitas 23: 9-15.
- Rubluo A (1990). Aplicaciones biotecnológicas para el rescate de cactáceas en peligro de extinción. Biotman 1 (4): 13-19.
- Salas JA, ME Sanabria, R. Pire. (2001). Variación en el Índice y densidad estomatica en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sometidas a tratamientos salinos . Bioagro 13 (3): 99-104.
- Santamaría JM y G Kerstiens (1994). The lack of control of water loss in micropropagated plants is not related to poor cuticle development. Physiologia Plantarum. 91:191-195.
- Santamaría JM, KP Murphy, C Leifert y PJ Lumsden (2000). Ventilation of culture vessels II. Increased water movement rather than reduced concentrations of ethylene and CO₂ is responsible for improved growth and development of *Delphinium in vitro*. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 75 (3): 320-327.
- Santos HL, LE Aguirre, CJ Campos, OM Martínez (2006). Conservación *in situ* de la flora mexicana: La Orquídea, *Laelia albida*, en una Reserva de la Biosfera. Ciencia y Desarrollo en Internet.
- Sarabia ME, Ávila DI, Gómez AC y Salgado GR (2010). Callus growth and plant regeneration in *Laelia speciosa* (Orchidaceae), Lankesteriana 10(1): 13—18. 2010.
- Sarasan VA, R Cripps, MM Rmasay, C Atherton, M McMichen, G Prendergast y JK Rowntree (2006). Conservation *in vitro* of threatened plants –Progress in the past decade. *In vitro* cell. Dev. Biol.- Plant 12:206-214.
- SEMARNAT. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2002). Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación; Tomo 488:10. México.
- Sheena M (2000). Manual para la germinación *in vitro* de orquídeas. Ceiba Foundation for Tropical Conservation. Pp 17.

- Shimura H e Y Koda (2004). Micropropagation of *Cypripedium macranthos* var. *Rebunenses* through protocorm-like bodies derived from mature seeds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 78: 273-276.
- Singer RB (2009). Morfología floral y polinización de orquídeas: el segundo libro de Charles Darwin. *Acta Biol. Colomb.*, Vol. 14 S, 2009 337 – 350.
- Soto MA (1990). *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr. *Die Orchideen* 233.1914. Eds. Hágsater E y GA Salazar. *Icones Orchidacearum* 1:52-53.
- Talavera CR, FL Espadas, ML Aguilar, BE Maust, CM Oropeza y JM Santamaría (2001). The control of leaf water loss by coconut plants cultured *in vitro* depends on the type of membrane used for ventilation. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 76 (5): 569-574.
- Teng WL, L Nicholson y MC Teng (1997). Micropropagation of *Spathoglottis plicata*. *Plant Cell Reports* 16: 831-835.
- Torres J y N Mogollón (2000). Micropropagación de *Cattleya mossiae* Parker Ex Hook mediante brotación axilar inducida por Tidiazurón. *Bioagro* 12(1): 10-14.
- Torres J, L Laskowski y M. A.. Sanabria. (2006). Efecto del ambiente de desarrollo sobre la anatomía de la epidermis foliar de *Cattleya jenmannii* Rolfe. *Bioagro* 18(2) : 93-99.
- Tsay HS, CY Lee, DC Agrawal y S Basker (2006). Influence of ventilation closure, gelling agent and explant type on shoot bud proliferation and hyperhydricity in *Scrophularia yoshimure* – A Medicinal Plant. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 12: 445-449.
- Vovides AP, V Luna y G Medina (1997). Relación de algunas plantas y hongos mexicanos raros, amenazados o en peligro de extinción y sugerencias para su conservación. *Acta Botánica Mexicana* 39:1-12.
- Ziv M (1991). Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. PC Debergh y Zimmerman (eds.), *Micropropagation* 45-69.

ANEXO 1

Medio de cultivo Knudson C (1946)

Macronutrientes

	mg/L	g/L	g/10 L	g/20 L
KH ₂ PO ₄	250	0.25	2.5	5
MgSO ₄ . 7H ₂ O	250	0.25	2.5	5
(NH ₄) .2SO ₄	500	0.50	5	10
MnSO ₄ H ₂ O	5.68	0.00568	0.0568	0.1136

	mg/ L	g/ L	g/10 L	g/20 L
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	1000	1	10	20

Sol Fe

	mg/ L	g/ L	g/10 L	g/20 L
FeSO ₄ .7H ₂ O	25	0.025	0.25	0.5

Sacarosa 20 g/ L

2g /L de carbón activado

Agar 8 g/ L

pH 5.0