



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

**Adaptación e instalación de un sistema de inmersión
temporal y su evaluación mediante la propagación *in
vitro* de *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A:

FERNANDO CUÉLLAR GONZÁLEZ

DIRECTORA: DRA. ANA LAURA LÓPEZ ESCAMILLA

Mineral de la Reforma, Hidalgo

2014

La presente investigación se realizó bajo la dirección de la Dra. Ana Laura López Escamilla en el Laboratorio de Morfofisiología Vegetal en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; México.

Agradecimientos

- A los catedráticos de la Licenciatura en Biología, por guiarme y acercarme los maravillosos conocimientos de la biología, fuentes de quienes con su dedicación y pasión, engrandecieron mi vida profesional.
- A mi directora de tesis, Dra. Ana Laura López Escamilla quien de ella admiro su calidad humana y sabiduría. Por la confianza, esfuerzo, paciencia y conocimiento otorgado. Demostrando en todo momento su compromiso y experiencia. Me acercó al fascinante mundo del cultivo de tejidos vegetales, del cual estoy satisfactoriamente agradecido.
- A mis sinodales (Dr. Miguel Ángel Villavicencio Nieto, M. en C. Manuel González Ledesma, Dra. Maritza López Herrera, Dra. Leticia Romero Bautista, Dra. María Teresa Pulido Silva y Dra. Claudia Teresa Hornung Leoni) quienes enriquecieron, complementaron y mejoraron con su admirable conocimiento la presente tesis.
- A mis compañeros del laboratorio de morfofisiología vegetal (Columba, Giovany, Ascención, Yuritzi, Ale y Rubi) quienes al compartir un espacio común se lograron crear lazos especiales.
- A los principales pilares de mi persona, mi familia, quienes con sus constantes y calurosas palabras me permiten siempre continuar. Reconociendo que lo más valioso que tengo es su amor.

Dedicatorias

- El presente logro esta directamente dirigido a mis dos ejemplos de vida, mi padre (Miguel Ángel Cuéllar Colín) y mi madre (Patricia González Muñoz) inmensurables fuentes de dedicación y apoyo. Admirables padres cuyos principios y enseñanzas formaron y forman mi persona. Su amor, es mi principal motivación de vida.
- A mis dos compañeros de vida, mis hermanos (Alejandro Cuéllar González y Miguel Ángel Cuéllar González) con quienes compartí y compartiré historias y aventuras maravillosas que nos enlazan. Continúo creándome una profunda admiración y cariño hacia ustedes.
- A mis amigos (Clara, Kevin, David, Ariadna, Nefaki, Paula, Jonatan, Yazmín, Liliana, Monse, Marcelo y Dulce) siendo parte fundamental de mi vida y cuyos caminos, deseo sigan siendo compartidos.

ÍNDICE	1
RESUMEN	3
I. INTRODUCCIÓN	4
II. ANTECEDENTES	5
1. Las orquídeas	5
a) Generalidades	5
b) Distribución	6
c) Orquídeas mexicanas	7
d) Situación y problemática	7
2. Estrategias de conservación	8
3. Cultivo de tejidos vegetales (CTV)	9
a) Generalidades	9
b) Propagación <i>in vitro</i>	10
c) Medios de cultivo, sólido y líquido	12
d) Biorreactores	13
4. Sistemas de Inmersión Temporal (SIT)	15
a) Historia y tipos de SIT	15
b) Los sistemas RITA y BIT	18
c) Características y ventajas	20
d) Propagación <i>in vitro</i> empleando un SIT	21
5. <i>Laelia speciosa</i>	25
a) Generalidades	25
b) Cultivo <i>in vitro</i>	26
III. JUSTIFICACIÓN	27
IV. OBJETIVOS	27
V. MATERIAL Y MÉTODO	28
1. Material vegetal	28
2. Instalación del Sistema de Inmersión Temporal (SIT)	28
a) Materiales	28
b) Armado de biorreactores	29
3. Determinación de la frecuencia y tiempo de inmersión	31
4. Evaluaciones morfológicas y coeficiente de multiplicación	32
5. Aclimatización <i>ex vitro</i> y porcentaje de supervivencia	33
6. Análisis estadísticos	33
VI. RESULTADOS	

1. Instalación del SIT	34
2. Determinación de la frecuencia y tiempo de inmersión	36
A) Datos morfológicos	36
a) Evaluación de la frecuencia de inmersión	36
b) Evaluación del tiempo de inmersión	37
B) Coeficientes de multiplicación	39
a) Evaluación de la frecuencia de inmersión	39
b) Evaluación del tiempo de inmersión	39
C) Aclimatización <i>ex vitro</i>	40
a) Evaluación de la frecuencia de inmersión	40
b) Evaluación del tiempo de inmersión	42
D) Supervivencia <i>ex vitro</i>	43
a) Evaluación de la frecuencia de inmersión	43
b) Evaluación del tiempo de inmersión	45
3. Frecuencia y tiempo de inmersión determinadas	47
a) Datos morfológicos	47
b) Aclimatización y supervivencia <i>ex vitro</i>	48
VII. DISCUSIÓN	52
VIII. CONCLUSIONES	59
IX. LITERATURA CITADA	61

Resumen

El empleo de los sistemas de inmersión temporal han demostrado incrementar la eficiencia en las técnicas de micropropagación. El objetivo del trabajo fue instalar un sistema de inmersión eficiente, de bajo costo y validarlo mediante la propagación *in vitro* de *Laelia speciosa* (Orchidaceae), especie endémica de México y sujeta a protección especial por la Norma Oficial Mexicana NOM-059 SEMARNAT-2010. El sistema de inmersión temporal, se construyó con materiales accesibles y disponibles en el mercado nacional lo que permite su fácil instalación y manejo, para probar la eficiencia del sistema y que conservara la condición de asepsia que se requiere en el cultivo *in vitro*, se utilizaron plántulas previamente regeneradas *in vitro* de *Laelia speciosa* como fuente de explante, las cuales se inocularon en el sistema de inmersión con medio Murashige y Skoog adicionado con Bencilaminopurina/Ácido naftalenacético 1/2 mgL⁻¹, donde estuvieron durante cuatro semanas, posteriormente se realizó un subcultivo en medio Murashige y Skoog basal, después de cuatro semanas. Se evaluaron diferentes parámetros morfológicos así como el coeficiente de multiplicación que permitieran establecer la mejor frecuencia y tiempo de inmersión por separado. Las plántulas obtenidas se establecieron en condiciones *ex vitro* y se evaluó periódicamente la cantidad de clorofila en unidades SPAD y el porcentaje de supervivencia a los 14, 40 y 60 días. La mejor frecuencia y tiempo de inmersión se conjuntaron y se realizó la siembra para evaluar los mismos parámetros morfológicos, de unidades SPAD y de supervivencia. Con una frecuencia de inmersión de seis veces al día y dos minutos de inmersión se lograron plántulas con mayores tallas, con promedios de 4.09 de longitud total, 3.0 de coeficiente de multiplicación y un porcentaje de supervivencia de 96.3% en comparación con las obtenidas en el cultivo sólido. El uso de esta técnica biotecnológica hizo más eficiente la propagación *in vitro* de *L. speciosa* siendo una alternativa viable para contribuir a su conservación.

I. INTRODUCCIÓN

México cuenta con una gran biodiversidad de orquídeas (Hágsater *et al.*, 2005; Soto *et al.*, 2007) desafortunadamente, varias poblaciones naturales han sido fuertemente afectadas, principalmente por la extracción masiva de plantas por parte del comercio ilegal, amenazando la persistencia de sus poblaciones (Ávila y Oyama, 2002; Hágsater *et al.*, 2005; Flores-Palacios y Valencia, 2007; Menchaca y Moreno, 2011). Una alternativa viable de conservación *ex situ* la representa las técnicas de cultivo por tejidos vegetales (Lascuráin *et al.*, 2009; Téllez, 2011) y la propagación *in vitro* es el método que mayores logros a aportado en la obtención masiva de plantas, sin embargo, estos no corresponden a los niveles industriales (Kitto, 1997; Jiménez y De Feria, 1998), además es sumamente costosa (Adelberg, 2004; George, 2008). Como alternativa se han desarrollado tecnologías que tienden a la semi-automatización con el empleo de medios líquidos, por una parte para reducir la mano de obra calificada y por otra para eliminar el agente solidificante (Alvarad y Teisson, 1993; Preil, 2005; Berthouly y Etienne, 2005). Los biorreactores combinan estas dos últimas cualidades (Paek *et al.*, 2001; Takayama y Akita, 2005), sin embargo, resultan ser equipos complejos y sumamente costosos además el contacto permanente del medio líquido con la planta crea anomalías fisiológicas, tales como la asfixia e hiperhidratación (Adelberg, 2004; Berthouly y Etienne, 2005; Ziv, 2005). Para superar estas desventajas se han desarrollado diferentes sistemas basados en la inmersión periódica de la planta con el medio líquido. Siendo el Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA) y el Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT) los más usados (Alvarad y Teisson, 1993; Escalona *et al.*, 1999; Berthouly y Etienne, 2005). Estos dos sistemas han logrado revolucionar los métodos tradicionales de micropropagación, consiguiendo mayores tasas de multiplicación, enraizamiento y aclimatización y niveles elevados de sobrevivencia *ex vitro* (Teisson y Alvarad, 1995; Berthouly y Etienne, 2005, Preil, 2005). Sin embargo, el BIT resulta ser más económico y fácil para su manipulación (Jiménez y De Feria, 1998; Berthouly y Etienne, 2005).

En el presente trabajo se instaló un sistema de inmersión temporal y se evaluó su eficiencia a través de la micropropagación de *Laelia speciosa* (Orchidaceae) especie endémica y sujeta a protección especial en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010), para aumentar la eficiencia en su cultivo *in vitro* y contribuir a su conservación.

II. ANTECEDENTES

1. Las orquídeas

a) Generalidades

Las orquídeas pertenecen a la familia Orchidaceae, presentan una gran diversidad, y es quizás la familia más grande de plantas con flor, se calculan entre 20,000 a 35,000 especies distribuidas en aproximadamente 800 géneros (Dressler, 1993; Hágsater *et al.*, 2005; Lecoufle, 2006). Han logrado establecerse en casi todos los ambientes de la tierra, usando de manera eficiente los nutrientes y el agua donde éstos son limitados. Una de sus características son sus complejas interacciones, por ejemplo, la asociación con hongos, árboles hospederos, hormigas mutualistas, y la más destacable, es sin duda la interacción con sus polinizadores (Hágsater *et al.*, 2005).

Habitan en ambientes tropicales y subtropicales, pocas habitan en zonas templadas o frías. Sus formas de vida son epífitas (viven sobre los árboles), rupícolas (viven sobre las rocas) y terrestres (viven sobre el suelo). Alcanzan tamaños desde los treinta metros de largo, y otras miden unos cuantos milímetros (Ramírez, 1996; Lecoufle, 2006).

Presentan dos hábitos de crecimiento: monopodial, en el cual se desarrollan mediante un solo vástago formando un eje principal y simpodial, en el que los ejes se forman por un conjunto de vástagos que se desarrollan de manera consecutiva formando un eje compuesto. Unas pocas más son trepadoras como la vainilla (Larson, 1988; Hágsater *et al.*, 2005).

Las raíces pueden ser simples, ramificadas, o suculentas. En las orquídeas terrestres brotan de la base del tallo; en las epífitas, las raíces surgen de la base y a lo largo de los tallos. La epidermis forma usualmente un tejido esponjoso constituido por células muertas llamado velamen (Hágsater *et al.*, 2005; Bellone, 2006).

Las hojas de las orquídeas para todos los casos son simples; las formas van desde oval, casi redonda, hasta un perfil de lanza (lanceolada) o casi lineal (Hágsater *et al.*, 2005; Bellone, 2006).

En general el fruto de las orquídeas son cápsulas que contienen entre 3 mil a 6 millones de diminutas semillas que miden entre 0.3 y 0.4 mm, pesan desde 0.4 a 2 µg (Pierik, 1990; Ramírez, 1996; Hágsater *et al.*, 2005).

La estructura más atractiva de las orquídeas es la flor, se agrupan en racimos o panículas de dos a veinte, pero frecuentemente de forma individual. La flor es de simetría bilateral; se arreglan en verticilo externo de tres sépalos y verticilo interno de tres pétalos. El pétalo medio es mayor, más colorido y/u ornamentado, llamado labelo. Una característica única de las orquídeas es la fusión de los órganos sexuales (el estilo del pistilo y los filamentos de los estambres) estructura llamada columna (Ramírez, 1996; Hágsater *et al.*, 2005; Bellone, 2006; Singer, 2009).

b) Distribución

Las orquídeas presentan una distribución cosmopolita, exceptuando los océanos y desiertos, se han hallado siete especies en la zona ártica. Se presentan en todos los climas y en todas las altitudes, desde el nivel del mar hasta más de 3500 metros sobre el nivel del mar. Las tres regiones más abundantes son América Tropical, Asia tropical y África tropical (Bellone, 2006; Flores, 2006; Lecoufle, 2006).

En México se distribuyen sobre 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. Los estados con mayor riqueza de

orquídeas son Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Veracruz y Chiapas. Aunque todos los estados cuentan con por lo menos una especie (Ramírez, 1996; Flores-Escobar *et al.*, 2008; Menchaca y Moreno, 2011).

c) Orquídeas mexicanas

México cuenta con una orquideoflora importante, se registran alrededor de 1260 especies distribuidas en 170 géneros y 21 taxa subespecíficos (Soto *et al.*, 2007). Además se han registrado 444 especies o subespecies endémicas, correspondiendo aproximadamente al 40% del total de taxa del país (Ávila y Oyama, 2002; Flores-Escobar *et al.*, 2008). Ésta característica convierte a México en uno de las más ricos en endemismos entre los países de América tropical, quizás sólo superado por Brasil (Ramírez, 1996).

Desafortunadamente tanto las actividades humanas, como la propias características biológicas de estas plantas, han propiciado que en México durante los dos últimos siglos, se hayan extinguido varias especies de orquídeas, desde 1998 a 2005 por lo menos, 22 especies se han reportado como extintas (Hágsater *et al.*, 2005).

Por su parte la Norma Oficial Mexicana (SEMARNAT, 2010) registra 188 especies de orquídeas en alguna categoría de riesgo, siendo 75 endémicas; 62 se encuentran en la categoría de amenazadas (A), 110 sujetas a protección especial (Pr), 15 en peligro de extinción (P) y una especie probablemente extinta en el medio silvestre (E), *Laelia gouldiana*.

d) Situación y problemática

Las poblaciones silvestres de orquídeas han sido fuertemente afectadas, por un lado, las orquídeas poseen un alto valor ornamental y con ello comercial, esta situación ha aumentado su interés por coleccionarlas y con ello incrementa su vulnerabilidad al ser sobreexplotadas; en este sentido otras actividades contribuyen a esta situación como, la alteración y destrucción de hábitats, deforestación, cría de ganado, agricultura y extracción de madera; y por otro lado las orquídeas presentan características ecológicas adversas como bajas tasas de

crecimiento, ciclos de vida relativamente largos y el escaso reclutamiento de nuevos individuos, el proceso de polinización es bastante limitado debido a su alto grado de especialización, a causa de su estrecha correlación evolutiva entre polinizador-planta. Para la germinación se requiere de condiciones específicas dificultando su reproducción, aunado a esto, la semilla requiere de la asociación del embrión con determinado hongo, además las semillas contienen muy poca o nula reserva alimenticia, es decir, carecen de endospermo (Pierik, 1990; Ávila y Oyama, 2002; Hágsater *et al.*, 2005; Ávila y Oyama, 2007; Menchaca y Moreno, 2011).

Es importante tomar acciones que conlleven a un manejo sustentable de las orquídeas mexicanas, el reto no sólo es prohibir el uso tradicional de algunas especies, sino generar programas de reproducción y repoblación para su aprovechamiento, entre las que se tiene el establecer sistemas de micropropagación para conseguir la reproducción de forma masiva para reducir en cierta medida el saqueo de especies de sus poblaciones naturales (Menchaca y Moreno, 2011).

2. Estrategias de conservación

La conservación se define como la disciplina dedicada a la preservación, rescate, manutención, estudio y utilización del patrimonio que representa la biodiversidad (Lascuráin *et al.*, 2009). La conservación de la flora y de la fauna, pueden realizarse de dos formas, dentro del hábitat natural, *in situ*, y fuera del mismo, *ex situ*. Éstas son modalidades complementarias (Pezoa, 2001).

El Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) en 1992, define a la conservación *in situ* como la conservación, mantenimiento y recuperación de las poblaciones viables en sistemas dinámicos y evolutivos del hábitat original o, en el caso de especies cultivadas, en el entorno en que hayan desarrollado sus características (Glowka *et al.*, 1996; Urquiza, 2009).

En cuanto a la conservación *ex situ*, la define como la conservación de muestras genéticamente representativas de las especies o cultivos, que se mantienen

viables a través del tiempo, fuera de sus hábitats naturales o lugares de cultivo, en ambientes controlados y con el apoyo de tecnologías adecuadas (Glowka *et al.*, 1996; Peña *et al.*, 1998).

El objetivo central de la conservación *ex situ* es reducir el riesgo de extinción de especies o poblaciones, ésta es valiosa para realizar estudios y el desarrollo de técnicas, como criopreservación, jardines botánicos, bancos de germoplasma, cultivo en instalaciones dedicadas a la conservación, banco de genes de campo, cultivo especializado en ambientes controlados y reproducción *in vitro* (Lascuráin *et al.*, 2009; Téllez, 2011).

Los esfuerzos para la conservación *ex situ* de orquídeas en general se desarrollan en jardines botánicos, colecciones privadas, orquidarios, unidades de manejo ambiental y en laboratorios de cultivo de tejidos vegetales (Lascuráin *et al.*, 2009; Téllez, 2011).

3. Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV)

a) Generalidades

Los orígenes del CTV se remontan a 1902 con los trabajos de Haberlandt, el cual aisló células y tejidos de plantas, y las colocó en soluciones nutritivas; convirtiéndose en el padre de la técnica de cultivo de células y tejidos vegetales, además, postuló el principio de la totipotencia celular, que es la base teórica sobre la que se sustentan las técnicas del cultivo *in vitro* (Jiménez, 1998; Calva y Pérez, 2005).

El CTV puede definirse como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de un explante (parte separada de una planta madre) con potencial de diferenciación por ejemplo: ápices de raíz o tallo, primordios de hoja, primordios o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de tallo, hoja, tejidos, células, protoplastos, ovarios, óvulos, anteras y polen; *in vitro* (del latín en vidrio), empleando medios nutritivos, bajo condiciones de ambiente controlado (Mroginski

y Roca, 1991; Navarro y Vera, 1991; Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994; Jiménez, 1998; Calva y Pérez, 2005).

Calva y Pérez (2005), mencionan que el CTV representa una serie de ventajas entre las que destacan: la investigación básica, micropropagación, producción de compuestos secundarios, proteínas y productos transgénicos, se realizan estudios en un tiempo mucho menor y bajo condiciones controladas.

Los objetivos y posibilidades de aplicación del cultivo *in vitro* son numerosos (Mroginski y Roca, 1991; Jiménez, 1998), entre los que se pueden mencionar:

- Estudios teóricos sobre fisiología, genética, bioquímica vegetal y ciencias afines.
- Propagación *in vitro* o micropropagación de plantas.
- Obtención de plantas libres de patógenos.
- La conservación e intercambio de germoplasma.
- Producción de metabolitos secundarios.
- El mejoramiento genético y la ingeniería genética.

La propagación *in vitro* es la técnica que ha trascendido con éxito de los ámbitos experimentales, a la aplicación práctica (Villalobos y Thorpe, 1991).

b) Propagación *in vitro*

La propagación *in vitro* se refiere prácticamente a una multiplicación masiva *in vitro* (Villalobos y Thorpe, 1991). Se posibilita el establecimiento de cultivares valiosos libres de microorganismos y difíciles de obtener por métodos de cultivo tradicionales (Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994; Kitto, 1997; Calva y Pérez, 2005). En este sentido Jiménez, (1998), menciona que esta metodología presenta importantes ventajas sobre los métodos tradicionales de propagación tradicional, de entre ellas se pueden citar:

- Altos coeficientes de multiplicación de plantas en una superficie reducida y en un tiempo económicamente costeable.
- Reducción del tiempo de multiplicación.

- Mayor control sanitario del material que se propaga.
- Facilidad de transportar el material *in vitro*.
- Introducción rápida de nuevas variedades o variedades de las cuales existen pocos individuos.
- Producción independiente de las condiciones ambientales.
- Incremento en los rendimientos debido al rejuvenecimiento y al saneamiento.
- Uniformidad en las plantas producidas.
- Mayor facilidad en la comercialización.

En la propagación *in vitro* es útil destacar una secuencia de eventos que pueden diferenciar las etapas o fases críticas para lograr una exitosa multiplicación.

La etapa 0 (inicial), la cual comprende la selección de la planta madre y la selección de una modalidad de pretratamiento. En la etapa I (establecimiento), se establece el cultivo inicial, el propósito general es lograr un cultivo axénico y viable. La etapa II (multiplicación), se persigue lograr la proliferación. La etapa III (enraizamiento), tiene como objetivo producir una planta autotrófica que pueda sobrevivir en las condiciones del trasplante al suelo. La etapa IV (aclimatización), es la transferencia final al medio ambiente (Krikorian, 1991; Villalobos y Thorpe, 1991; Orellana, 1998 a,b).

Pierik (1990), indica que el crecimiento y desarrollo *in vitro* de una planta está determinado por una serie de factores, éstos determinan el éxito en los sistemas de propagación *in vitro* (Villalobos y Thorpe, 1991; Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994) A continuación se mencionan aquellos más importantes.

a) Planta donante, el estado fisiológico y la edad fisiológica de la planta madre influye significativamente en su capacidad morfogenética.

b) El explante, es la parte de la planta que ha sido extraída del material parental para iniciar el cultivo *in vitro*. En general, factores como el genotipo, edad de la planta y su estado fisiológico son importantes a considerar.

c) Factores físicos, estos juegan un factor determinante, de entre ellos se pueden mencionar: pH, intercambio gaseoso, humedad, luz y temperatura.

d) Medio de cultivo, consiste en una mezcla de determinadas sustancias sobre o dentro del cual crecen los explantes. El éxito en el cultivo de tejidos depende de la selección del medio de cultivo, incluyendo su composición química y su forma física.

c) Medios de cultivo, sólido y líquido

En general el medio de cultivo usado es en estado sólido, lo cual se logra empleando distintos agentes gelificantes como Gelrite, Phytigel o Agar (Sharma, 1992; Orellana, 1998b). Sin embargo su uso representa una serie de inconvenientes como, tediosos procesos de preparación, la poca superficie de absorción por parte de la planta, manipulación y un aumento de costo por unidad debido al agente gelificante que representa entre el 70% y 90% del costo total del medio. Es por ello que en muchos casos se ha recurrido al empleo de medios en estado líquido (Orellana, 1998b; Adelberg, 2004; George, 2008), éstas representan las siguientes ventajas:

- Mayor facilidad y menor tiempo en la preparación, esterilización, manipulación y posterior lavado de los contenedores.
- Más rapidez en la absorción de nutrientes y la difusión de sustancias tóxicas producidas por el propio metabolismo de las plantas.
- Se evitan las impurezas de los agentes solidificantes orgánicos.
- Incremento en el número de plantas obtenidas.
- Facilidad en la eliminación del medio de cultivo para su transferencia *ex vitro*.
- Disminución en los costos en la elaboración del medio de cultivo.
- El cambio en la composición del medio de cultivo puede efectuarse por simple transferencia.
- Facilidad de automatización.
- Acelera el crecimiento vegetal.

Sin embargo la mayor limitante del uso de medio líquido es la vitrificación, que es el desorden fisiológico causado por grandes cantidades de agua en espacios apoplásticos, provocando pobre calidad de las plantas y pérdidas durante la aclimatización y la necesidad de utilizar costosos sistemas mecánicos (Alvarad y Teisson, 1993; Teisson y Alvarad, 1995; Orellana 1998b; Adelberg, 2004).

Los altos costos de personal calificado que demandan estas técnicas, es el factor limitante para el desarrollo de esta industria. La posibilidad de bajar los costos, ampliando el rango de especies beneficiadas, sólo será posible con el desarrollo y puesta de tecnologías más eficientes desde el punto de vista biológico y económico, posibilitando un grado de automatización de los procesos y con ello desarrollar protocolos de regeneración de plantas más eficientes (Sharma, 1992; Vasil, 1994; Jiménez, 1998; Orellana, 1998a).

d) Biorreactores

Se han diseñado equipos y sistemas que posibilitan el uso de medios líquidos en la propagación masiva, en los cuales la mano de obra se minimiza (Orellana, 1998a), estos equipos se denominan “biorreactores” y su función básica es proveer un crecimiento óptimo mediante la regulación de parámetros físicos y químicos usando unidades controladoras de: temperatura, pH, aireación, agitadores y otros dispositivos (Jiménez y De Feria, 1998; Paek *et al.*, 2001; Peak *et al.*, 2005, Preil, 2005).

Su uso brinda ventajas como, la producción de grandes volúmenes de plantas y mayor facilidad de escalado, la manipulación la inoculación y la cosecha es fácil, los explantes están siempre en contacto con el medio de cultivo por lo tanto la absorción de nutrientes y tasa de crecimiento se ven beneficiados, la aireación forzada estimula el incremento de biomasa y el control de suministro de nutrientes y/o factores de crecimiento es más preciso (Jiménez y De Feria, 1998; Paek *et al.*, 2001; Takayama y Akita, 2005).

Los sistemas que usan medio líquido pueden ser clasificados en dos grupos: sistemas de cultivo permanente o sistemas de inmersión parcial (Adelberg, 2004).

Los primeros a su vez están fundamentalmente clasificados en dos: los agitados mecánicamente (biorreactores con tanques de agitación, de tambor rotatorio y los giratorios con filtro) y los biorreactores con agitación neumática o sin ésta, por ejemplo los biorreactores con columna de burbujas, con levantamiento de aire y el tipo globo con burbujeo. Éstos son modificaciones de fermentadores y cultivos en suspensión usados originalmente para el cultivo de microorganismos (Jiménez y De Fera, 1998; Peak, *et al.*, 2001; Peak *et al.*, 2005; Ziv, 2005; Mehrota *et al.*, 2007).

Sin embargo, el empleo de estos sistemas representa una serie de desventajas (Vasil, 1994; Peak *et al.*, 2001; Adelberg, 2004; Berthouly y Etienne, 2005; Ziv, 2005), por ejemplo:

- Complejos y costosos sistemas tecnológicos, esto incluye una importante inversión por reparación o reemplazo del equipo si se descomponen.
- Bombas y contenedores específicos para el cultivo.
- Fuerzas mecánicas para rotar y cortar los tejidos vegetales.
- Complejos aparatos para manejar el oxígeno y relaciones hídricas.
- Pérdidas por contaminación debido al uso de contenedores de mayor tamaño.
- Asfixia e hiperhidratación, debido al constante contacto del medio líquido con el explante.

Los sistemas de inmersión parcial, son más simples, incluyen la inserción de materiales inertes en frascos como puentes de papel, membranas o esponjas, también existen plataformas mecedoras o balancines que evitan la inmersión constante del explante. Otra forma de inmersión parcial se basa en la utilización de flujos de aire que mueven fluidos entre reservorios y frascos de cultivo, éstos son conocidos como Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) (Alvarad y Teisson, 1993; Adelberg, 2004; Berthouly y Etienne, 2005; Farahani y Majd, 2012).

4. Sistemas de Inmersión Temporal (SIT)

a) Historia y tipos de SIT

Existen diferentes sistemas diseñados para lograr que el contacto entre la planta y el medio de cultivo sea de manera intermitente, éstos difieren en cuanto al tamaño del contenedor, el tipo de soporte de cultivo, el control computarizado de las inmersiones o un simple temporizador, así como el uso de bombas peristálticas o de aire o de movimientos mecánicos para desplazar el medio líquido (Etienne y Berthouly, 2002).

Uno de los primeros aparatos diseñados para lograr la inmersión parcial, es el descrito por Harris y Mason (1983) y se trata de una máquina de inclinación. En un matraz Erlenmeyer se coloca el material vegetal, cuando la máquina hace inclinar el envase 30° hacia una dirección, los explantes quedan aislados del medio y en dirección opuesta, los explantes quedan sumergidos en el medio.

Dichos autores hacen mención del aparato diseñado por Stewart *et al.* (1952), el cuál es el primer sistema diseñado con el propósito de lograr la inmersión parcial llamado “los aparatos Stewart” ó “Auxophyton”, éste utiliza recipientes de cultivo colocados en una rueda que gira a 1 revolución por minuto dejando el recipiente de cultivo en un ángulo de 10-12°. Este aparato logra que los explantes se encuentren de manera alternativa, aislados o sumergidos en el medio líquido.

A partir de dichos aparatos se han desarrollado una amplia gama de sistemas semi-automáticos que aplican el principio de inmersión parcial.

De entre ellos se pueden citar, el sistema automatizado de cultivo de plantas (SACP) ó APCS por sus siglas en inglés, desarrollado por Tisserat y Vandercook (1985). Se trata de una cámara de cultivo, la cual, se llena o drena con medio líquido. Cabe mencionar que es el primer aparato diseñado para operar de acuerdo al principio de flujo y reflujos de aire, que logra mover el medio (Fig. 1).

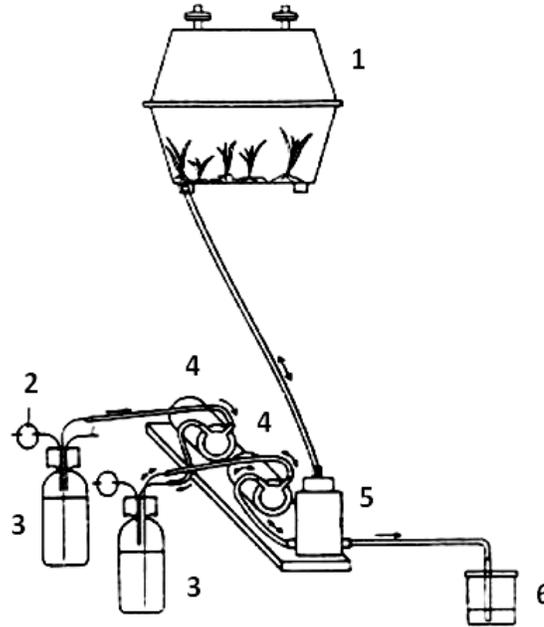


Figura 1. Representación esquemática del sistema de inmersión temporal semi-automático SACP. (1) Cámara de cultivo (2) Filtro de aire (3) Reservorios (4) Bombas de aire (5) Válvula (6) Contenedor de residuos. Tomado de (Berthouly y Etienne, 2005).

El sistema semi-automatizado para la micropropagación desarrollado por Aitken-Christie y Davies (1988) utiliza contenedores de policarbonato de (250 X 390 X 120 mm). Este sistema funciona mediante bombas peristálticas; el medio líquido migra desde un contenedor con medio fresco, entra en contacto con la planta, y después de un determinado tiempo el medio es succionado a un contenedor de residuos (Fig. 2).

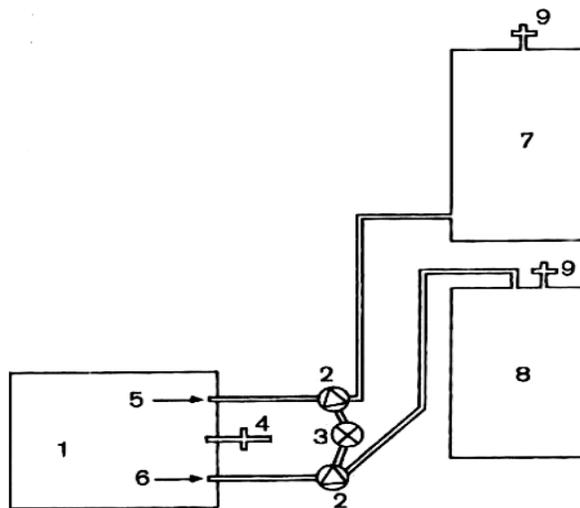


Figura 2. Representación esquemática del sistema semi-automatizado para la micropropagación. (1) Contenedor (2) Bombas peristálticas (3) Reloj programable (4) Puerto de aireación (5) Entrada de nutrientes (6) Salida de nutrientes (7) Reservorio de nutrientes (8) Reserva de desechos (9) Puerto de aireación Tomado de (Berthouly y Etienne, 2005).

El aparato semi-automatizado desarrollado por Simonton *et al.* (1991) es un sistema computarizado que permite la introducción de medio líquido a cuatro recipientes de cultivo con horarios programables (Fig. 3).

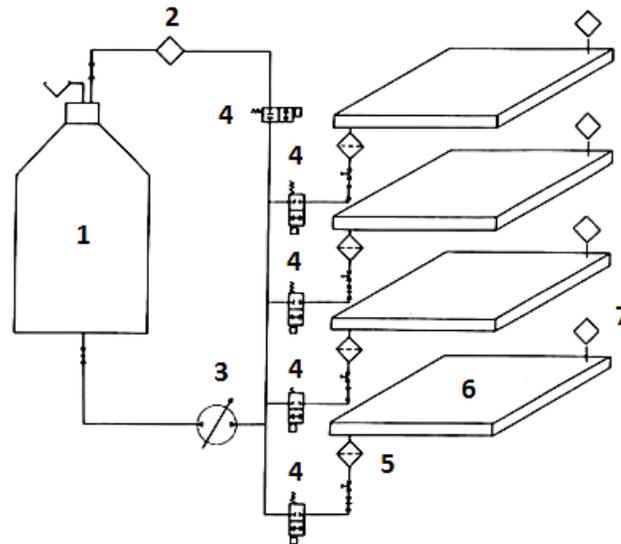


Figura 3. Representación esquemática del sistema semi-automatizado desarrollado por Simonton *et al.*, (1991). (1) Reservorio de medio (2) Filtro (3) Bomba peristáltica (4) Válvulas de solenoide (5) Filtrador (6) Contenedores del cultivo (7) Filtro de ventilación. Tomado de (Berthouly y Etienne, 2005).

Después de la publicación de Alvarad y Teisson (1993), se describen dos sistemas, los cuales, son los más usados actualmente. Éstos, permiten el contacto del medio líquido sobre todo el explante y logran una renovación completa de la atmósfera de cultivo por ventilación forzada. Esto se logra mediante la transferencia neumática desde el depósito de medio líquido hacia el recipiente que contiene las plantas. Lo anterior se logra mediante la aplicación de presión de aire a través de una válvula de solenoide conectada a una compresora, todo gobernado mediante un programador de tiempo, el cual determina el tiempo y la duración de las inundaciones (Alvarad y Teisson, 1993; Teisson y Alvarad, 1995; George, 1998; Orellana, 1998a; Escalona *et al.*, 1999; Berthouly y Etienne, 2005).

Dos variantes han sido desarrolladas a partir de dichos principios: el Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA) y el Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT) o sistema de frascos gemelos (Berthouly y Etienne, 2005).

b) Los sistemas RITA y BIT

En el año de 1995, en el CIRAD por sus siglas en francés (Le Recherche Agronomique pour le Développement), se crea el sistema denominado RITA, a manos de Teisson y Alvarad (1995). Éste consiste en un recipiente con capacidad de 1 litro que a su vez se divide en dos compartimentos, dichos compartimentos están interconectados por medio de mangueras plásticas y un disco con poros selectivos. Las plantas se colocan en la parte superior y el medio líquido (generalmente 250 ml) en la parte baja. Al aplicar presión mediante una bomba de aire, el líquido se traslada a la parte superior sumergiendo la planta. Durante este periodo de inmersión el flujo del aire renueva la atmósfera dentro del envase, un programador se usa para el control de la frecuencia (número de veces que ocurre la inmersión al día), y el tiempo de inmersión (tiempo en que la planta esta sumergida en el medio). Cuando la presión se elimina, éste se escapa por una ventila colocada en la parte superior del aparato, entonces el medio regresa a la posición original por gravedad. Para evitar la contaminación se emplean filtros hidrofóbicos de 2 micras (Fig. 4) (Alvarad y Teisson, 1993; Teisson y Alvarad, 1995; Jiménez y De Feria, 1998; Berthouly y Etienne, 2005).

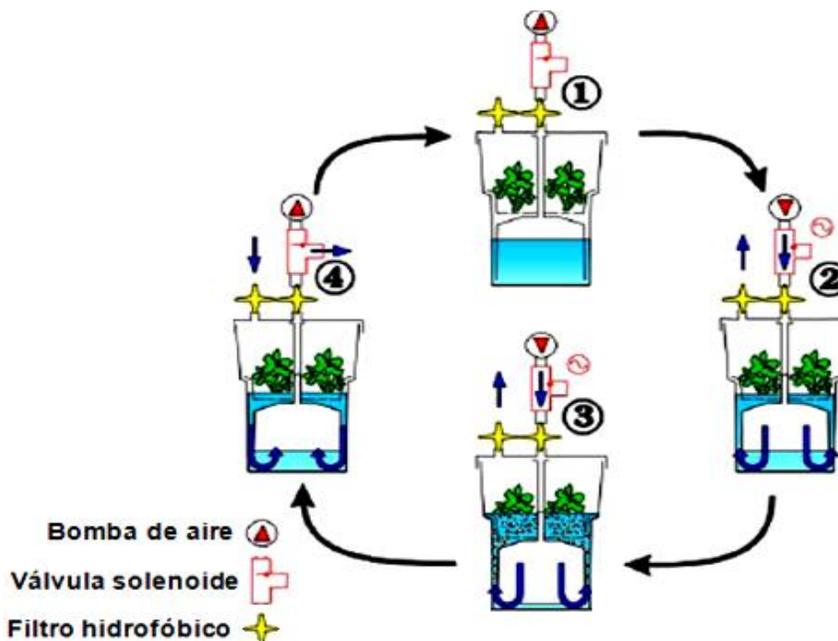


Figura 4. Representación esquemática del sistema RITA desarrollado por Alvarad y Teisson, 1993. (1) Período de reposo (2) Aplicación de presión, el medio migra a la parte superior (3) Tiempo de inmersión, las plantas son sumergidas (4) Se detiene la presión y el medio líquido regresa a su posición original. Tomado de (Berthouly y Etienne, 2005).

Sin embargo, a pesar de los variados beneficios que implicó el surgimiento del sistema RITA, resulta un equipo costoso debido a su calidad de patente, implicando grandes inversiones para laboratorios y empresas dedicadas al cultivo *in vitro* principalmente en países en vías de desarrollo.

El sistema desarrollado por científicos cubanos, en un principio llamado Sistema de Inmersión Temporal SIT (Escalona *et al.*, 1999) y que posteriormente se denominó Biorreactor de Inmersión Temporal BIT (Escalona *et al.*, 2003) corresponde a una variación más efectiva, es de hecho la vía más fácil para llevar a cabo la inmersión temporal. La principal característica es emplear dos frascos idénticos que van desde los 250 ml hasta los 10 L. Uno se usa para el crecimiento de las plantas y el otro como reservorio del medio líquido, ambos contenedores están interconectados por tubos de silicona, para ambos, se emplean filtros hidrofóbicos de 0.2 μm . Mediante el accionamiento neumático de un flujo de presión proveniente de una compresora, empuja el medio líquido a los respectivos contenedores receptores. Un programador eléctrico controla los periodos de frecuencia y tiempo de inmersión. Una válvula de solenoide de tres vías provee la operación del sistema (Fig. 5) (Escalona *et al.*, 1999; Berthouly y Etienne, 2005).

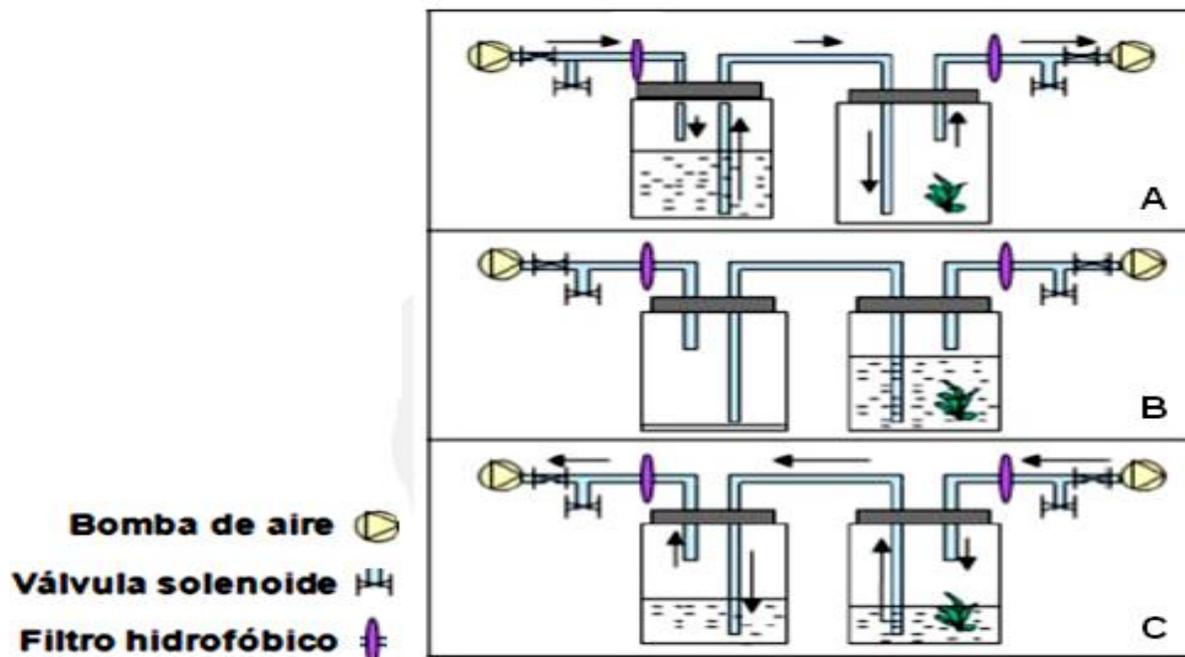


Figura 5. Representación esquemática del Biorreactor de Inmersión Temporal desarrollado por Escalona *et al.*, (1999). (A) Aplicación de presión desde el vaso que contiene el medio líquido (B) Migración del medio líquido, la planta es sumersión completamente (C) La presión se aplica desde el vaso de cultivo y el medio migra a su posición original. Tomado de (Escalona *et al.*, 1999).

c) Características y ventajas

A pesar de la cantidad de variantes que existen en cuanto a los SIT, éstos se caracterizan por lo que Berthouly y Etienne (2005) mencionan: eliminar la inmersión continua que afecta negativamente el crecimiento y morfogénesis, proveer de una transferencia de oxígeno adecuada, permitir el cambio secuencial y automático del medio, reducir el riesgo de contaminación y ser lo más baratos posibles.

En general los SIT son mucho más fáciles de manipular en comparación con los biorreactores convencionales, la originalidad es permitir la inmersión parcial o total entre el explante y el medio líquido, con tiempos programables. Característica que no suelen presentarse en otros procedimientos de cultivo de tejidos *in vitro*. (Alvarad y Teisson, 1993; Berthouly y Etienne, 2005).

Su empleo representa una serie de ventajas, (Berthouly y Etienne, 2005; Preil, 2005):

- Evitan la inmersión continua, lo cual afecta negativamente el crecimiento y morfogénesis trayendo como consecuencia fenómenos como la hiperhidratación.
- Obtención de un número elevado de plántulas producidas fácilmente en el proceso de escalamiento de un cultivo.
- Se proporciona una mejor transferencia de oxígeno mediante la aireación forzada, lo cual optimiza la absorción del suministro de gases lo cual mejora las tasas de crecimiento y biomasa final.
- Reducen el riesgo de contaminación.
- Reducción significativa de los costos por mano de obra, debido a que el manejo de los cultivos, tanto inoculación y mantención resulta más fácil.
- Es una tecnología accesible, es decir, son lo más baratos posibles.
- Permiten la renovación completa de atmósfera del cultivo mediante la aireación forzada permitiendo la dispersión de gases como el etileno y CO₂.

- Incremento en la absorción de los nutrientes por parte de los cultivos ya que existe un contacto mediante toda su superficie.
- Difusión de sustancias tóxicas debido al estado físico líquido del medio.
- Los explantes retienen una película del medio de cultivo que evita la desecación e incrementa la disponibilidad y asimilación de nutrientes.

Si bien el medio de cultivo tiene que ser cambiado después de 4 a 6 semanas, este cambio es rápido y no hay necesidad de transferir el material vegetal (Berthouly y Etienne, 2005).

d) Propagación *in vitro* empleando un SIT

Existe un gran número de investigaciones que reportan el uso de un SIT. Es común comparar su eficiencia en la micropropagación *in vitro* de diferentes especies vegetales, frente a diferentes métodos de cultivo *in vitro*, en la mayoría se compara frente al cultivo *in vitro* en estado sólido. Unos más lo comparan con cultivos líquidos estáticos (Alvarad y Teisson, 1993; Lorenzo *et al.*, 1998, Posada *et al.*, 2003; Cabrera *et al.*, 2008; Lezcano *et al.*, 2010; Cabrera *et al.*, 2011) cultivos líquidos con soportes inertes (Alvarad y Teisson, 1993; Farahani y Maid, 2012) y cultivos en biorreactor (Alvarad y Teisson, 1993; Park *et al.*, 2000; Cabrera *et al.*, 2008; Cabrera *et al.*, 2011; Farahani y Majd, 2012).

En la mayoría de los trabajos ésta comparación resulta en parámetros superiores como: peso fresco y seco, coeficiente de multiplicación, costo económico, altura de la plántula, hoja y raíz, clorofila a y b, tasa fotosintética con el empleo de los SIT, con excepción del trabajo de Jones y Flores (2007) micropropagando frambuesa (*Rubus idaeus* L.) con un coeficiente de multiplicación estadísticamente similar en plántulas obtenidas en ambos sistemas de cultivo *in vitro* y Espinosa *et al.* (2007) con violeta africana (*Saintpaulia ionnata*) obteniendo plántulas con mayor longitud y número de hojas en cultivo sólido.

La determinación del tiempo y frecuencia de inmersión, son considerablemente variados, incluso en plantas de la misma especie. En la mayoría de los trabajos no se evalúa este importante parámetro.

En la gran mayoría de investigaciones se han propagado *in vitro* plantas con interés económico como diferentes variedades de plátano (*Musa* spp.) (Alvarad y Teisson, 1993; Matsumoto y Brandão, 2002; Posada *et al.*, 2003; Roels *et al.*, 2005; Farahani y Majd, 2012) variedades de caña de azúcar (Lorenzo *et al.*, 1998; Posada *et al.*, 2003) papa (*Solanum tuberosum*) (Jiménez, 1998) orquídea (*Phalenopsis*) (Park *et al.*, 2000; Hempling y Preil, 2005; Tirado *et al.*, 2005) ñame (*Dioscorea* spp.) (Salazar y Hoyos, 2007; Cabrera *et al.*, 2008; Cabrera *et al.*, 2011) entre otras plantas, siendo menores los trabajos que reportan la propagación *in vitro* de plantas ornamentales.

En ningún trabajo con el empleo de un SIT, se reporta plántulas con hiperhidratación u otras anomalías fisiológicas.

Pocos trabajos evalúan la importante etapa de aclimatización (Hempling y Preil, 2005; Tirado *et al.*, 2005; Alvarenga, 2010; Steinmacher *et al.*, 2011; Vilchez *et al.*, 2011) (Tabla 1).

Tabla 1. Principales investigaciones de cultivo *in vitro* empleando sistemas de inmersión temporal (SIT)

Especie	Uso	SIT	TI Y FI (min) (veces al día)	CM en SIT	CM en otros métodos de cultivo <i>in vitro</i>	PS <i>ex vitro</i>	Autor
<i>Musa acuminata</i> var. AAA	Comercial	RITA®	20 y 12	5.2	2.2 (MSS) 0.7(MLE) 1.3 (MLSC) 3.0 (BAB)	NE	Alvarad y Teisson, 1993
<i>Sacharum</i> sp. var. C-1501-73	Comercial	BIT	2 y 2.6	8.13	3.96 (MSS) 4.00 (MLE)	NE	Lorenzo <i>et al.</i> , 1998
<i>Phalenopsis</i>	Ornamental	RITA®	5 y 12	18	10.8 (BAB) 6.1 (BCA)	NE	Park <i>et al.</i> , 2000
<i>Musa</i> sp. "Maca" (AAB)	Comercial	BIT de (10L)	4 y 6	34.6	2.67 (MSS)	NE	Matsumoto y Brandão, 2002
<i>Saccharum</i> spp. var. Cuba 214-85 y IBP 89-112	Comercial	RITA®	1 y 3	17.67	3.72 (MSS) 3.85 (MLE)	NE	Posada <i>et al.</i> , 2003
<i>Musa</i> spp. var. FHIA-01 y FHIA-18	Comercial	RITA®	1 y 3	5.0 ; 6.3	1.0; 2.5 (MSS) 1.2; 2.8 (MLE)	NE	Posada <i>et al.</i> , 2003
<i>Anthurium andreanum</i>	Ornamental	BIT (1L)	2 y 6	17. 63	2.87 (MSS)	NE	Rivero <i>et al.</i> , 2004
<i>Phalenopsis</i>	Ornamental	BIT (5L)	10 y 8	25.0	3.0 (MSS)	94%	Hempfling y Preil, 2005.
<i>Musa</i> sp. var. AAB	Comercial	BIT	22 y 4.8	5.2	2.8 (MSS)	NE	Roels <i>et al.</i> , 2005
<i>Phalenopsis</i>	Ornamental	RITA®	1 y 6	8.2 protocormos	NE	80%	Tirado <i>et al.</i> , 2005
<i>Saintpaulia ionnata</i>	Ornamental	BIT	5 y 2	21.2	9.65 (MSS)	NE	Espinosa <i>et al.</i> , 2007
<i>Rubus idaeus</i> L.	Comercial	RITA®	2 y 2	1.6	1.6 (MSS)	NE	Jones y Flores, 2007

Abreviaturas: **TI** (Tiempo de Inmersión), **FI** (Frecuencia de Inmersión), **CM** (Coeficiente de Multiplicación), **MLSA** (Medio líquido con soporte de algodón), **MS** (Medio Sólido), **BCA** (Biorreactor con columna de aire), **BAB** (Biorreactor con aireación por burbujas), **MLE** (Medio líquido estático), **LEA** (Líquido en Erlenmeyer agitado), **MLSC** (Medio líquido con soporte de celulosa), **NE** (No evaluado), **PS** (Porcentaje de supervivencia).

Continúa...Tabla 1:

Especie	Uso	SIT	TI Y FI (min) (veces al día)	C.M. en SIT	CM en otros métodos de cultivo <i>in vitro</i>	PS <i>ex vitro</i>	Autor
<i>Dioscorea alata</i> L.	Comercial	RITA ®	10 y 2	10.07	5.66 (MS)	NE	Salazar y Hoyos, 2007
<i>Aloe vera</i> L. <i>Burm. f.</i>	Comercial	RITA ®	1 y 3	2.75	1.84	NE	Vilchez <i>et al.</i> , 2007
<i>Dioscorea cayensis</i> var. Blanco de guinea	Comercial	BIT (5L)	10 y 4	8.5	6.60 (BAB) 4.70 (MLE)	NE	Cabrera <i>et al.</i> , 2008
<i>Uncaria tomentosa</i>	Comercial	RITA ®	3 y 8	NE	NE	62% (SIT) 5% (MSS)	Alvarenga, 2010
<i>Paeonias</i> sp. var. SeSu	Ornamental	BIT	4 y 3	7.0	3.0 (MSS) 3.0 (MLE)	NE	Lezcano <i>et al.</i> , 2010
<i>Zantedeschia</i> spp. var. Treasure Golden Affair y Majestic Red.	Ornamental	BIT	3 y 6	7.93/10.66/11.3	3.96/3.7/7.23 (LEA) 3.63/6.5/4.26 (MS)	NE	Sánchez <i>et al.</i> , 2010
<i>Dioscorea alata</i> var. Pacala Duclos	Comercial	BIT	10 y 3	8.6	7.8 (BAB) 5.6 (MLE)	NE	Cabrera <i>et al.</i> , 2011
<i>Eucalyptus globulus</i>	Forestal	BIT	2 y 2	37.8	NE	NE	González <i>et al.</i> , 2011
<i>Bactris gasipaes</i>	Comercial	BIT (1L)	3 y 4	62.1 embriones somáticos a partir de 100 mg de explante	44.9 embriones somáticos a partir de 100 mg de explante	65% (SIT) 97% (MS)	Steinmacher <i>et al.</i> , 2011
<i>Xanthosoma sagittifolium</i>	Comercial	RITA ®	5 y 6	15.27	3.0 (MSS)	96.87%	Vilchez <i>et al.</i> , 2011
<i>Musa</i> sp. var. Dwarf Cavendish	Comercial	RITA ®	20 y 24	7.0	2.7 (MS) 3.5 (MLSA) 0.3 (BAB)	NE	Farahani y Majd, 2012

Abreviaturas: **TI** (Tiempo de Inmersión), **FI** (Frecuencia de Inmersión), **CM** (Coeficiente de Multiplicación), **MLSA** (Medio líquido con soporte de algodón), **MS** (Medio Sólido), **BCA** (Biorreactor con columna de aire), **BAB** (Biorreactor con aireación por burbujas), **MLE** (Medio líquido estático), **LEA** (Líquido en Erlenmeyer agitado), **MLSC** (Medio líquido con soporte de celulosa), **NE** (No evaluado), **PS** (Porcentaje de supervivencia).

5. *Laelia speciosa*

a) Generalidades

Nombres comunes: “flor de mayo”; “flor grande”; “flor de corpus”; “tlacuxóchitl”, “dentza”, “itzámahua” (Purépecha); “chichiltictepetzacuxóchitl” (Náhuatl).

Especie endémica de México, es una planta epífita, raramente litófito, con pseudobulbo globular u ovoide que lleva a una rígida hoja terminal, la inflorescencia mide entre 15 a 25 cm con 1 a 2 flores grandes de entre 10 a 16 cm de diámetro (Fig. 6) (Halbinger y Soto, 2007).

Es endémica de las sierras Madre Occidental y Oriental, la faja volcánica transversal y la parte sur de la altiplanicie mexicana. Puede ser encontrada en los estados de Durango, Zacatecas, Aguascalientes, Jalisco, Guanajuato, Michoacán, Querétaro, Hidalgo, San Luis Potosí y Tamaulipas (Hágsater *et al.*, 2005; Halbinger y Soto, 2007).

La planta crece en encinos en bosques caducifolios (muchas veces sobre *Quercus deserticola* y *Q. laeata*) en altitudes de entre 1900 a 2500 metros (Hágsater *et al.*, 2005; Halbinger y Soto, 2007; Tellez, 2011).

Desafortunadamente *L. speciosa* es la orquídea mas colectada en México dado su valor ornamental y cultural, sus flores son utilizadas en festividades religiosas. Se coloca en la categoría de Protección especial (Pr) en la Norma Oficial Mexicana (SEMARNAT, 2010) aunque tenga una distribución amplia en México, un gran número de estos sitios han sido sobreexplotados y varias poblaciones se han extinguido localmente. Cientos de plantas son vendidas en calles y mercados mexicanos. Muchas personas, principalmente por parte del comercio ilegal, colectan de manera desmesurada las flores de las poblaciones silvestres, trayendo consigo un grave problema en la formación de semillas de manera



Figura 6. Flor de *L. speciosa* del invernadero del Centro de Investigaciones Biológicas. Tomado por: Fernando Cuéllar González

natural y el reclutamiento de nuevos individuos es lento. Si el comercio ilegal continua muchas poblaciones podrían ser eliminadas en un futuro (Hágsater *et al.*, 2005; Halbinger y Soto, 2007; Tellez, 2011).

b) Cultivo *in vitro*

Existen varios trabajos en los cuales se ha cultivado *in vitro* *L. speciosa*. Como el de Lezama (2004), el cual evaluó la germinación de *L. speciosa* obteniendo un mayor éxito en aquellas que fueron cultivadas en medio Knudson C adicionado con 0.02 mg L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃).

Barrera *et al.* (2005) reportan la germinación exitosa a las cinco semanas en medio MS sólido adicionado con 500 mg L⁻¹ de extracto de plátano, 500 mg L⁻¹ de carbón activado, 1g L⁻¹ de peptona, 2 mg L⁻¹ de bencilaminopurina (BAP) y 1 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA), se reporta una regeneración de plántulas a través de callos y a los 14 meses las plántulas fueron llevadas al invernadero reportando un porcentaje de supervivencia *ex vitro* del 90%.

Ávila y Salgado-Garciglia (2006) obtuvieron un 100% de germinación en medio (Murashige y Skoog, 1962) (MS) sólido al 100%, a los 30-45 días, la multiplicación de protocormos se logró con MS adicionado con (ANA/BAP) 0.1/0.5 mg L⁻¹. Con un porcentaje de supervivencia de 70% a los 90 días.

Ávila-Díaz *et al.* (2009) germinaron *L. speciosa* obteniendo mayor porcentaje (49%) a los 90 días con medio sólido MS al 100% de sus componentes, plántulas con mayor vigor se obtuvieron al adicionar MS con ANA/GA₃ 0.5/0.1 mg L⁻¹ a los 90 días de haber subcultivado, además se reporta un porcentaje de supervivencia *ex vitro* de 77.5 % en plántulas mayores a 5 cm a los 90 días.

Sarabia-Ochoa *et al.*, (2010) Reportan una mayor proliferación a los 60 días de PLB's (cuerpos parecidos a protocormos) en MS sólido adicionado con ANA/BAP 2.5/1.0 mg L⁻¹, además reportan un porcentaje de supervivencia *ex vitro* del 70%.

Ortega-Loeza *et al.* (2011) evaluaron la etapa de aclimatización de *L. speciosa* y determinaron que 20 días de pre-aclimatización en condiciones de invernadero es

el mejor tiempo, así como el uso de MS sólido con 40 g L⁻¹ de sacarosa. Después de 60 días reportan un 97.5% de supervivencia *ex vitro*.

Otro trabajo es el de Aguilar (2013), quien evaluó la germinación de *L. speciosa* procedentes de cápsulas inmaduras, obteniendo una germinación a los 10 días en medio MS sólido al 50%. En la fase de multiplicación después de 180 días, obtuvo sus mejores coeficientes de multiplicación y altura promedio en una combinación de BAP/ANA 1/2mg L⁻¹. La aclimatización fue también evaluada encontrando un porcentaje de supervivencia de 91% a los 90 días *ex vitro* con un tratamiento de pre-aclimatización de 90 días *in vitro* de MS sólido al 100% adicionado con 10% de extracto de plátano.

III. JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia de incrementar la eficiencia en las técnicas de propagación *in vitro*, con el empleo de tecnologías que tiendan a la automatización. Se instaló un Sistema de Inmersión Temporal de bajo costo, utilizando *Laelia speciosa* especie endémica de México, sujeta a protección especial por la Norma Oficial Mexicana NOM-059-2010, como modelo para validar el sistema con la finalidad de hacer más eficiente su propagación y contribuir a su conservación.

IV. OBJETIVOS

1. General

Instalar y evaluar un Sistema de Inmersión Temporal (SIT) a través de la propagación *in vitro* de *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr. (Orchidaceae) con diferentes parámetros morfológicos y su aclimatización *ex vitro*.

2. Específicos

1. Ensamblar un SIT con materiales accesibles y de bajo costo.
2. Determinar la frecuencia y tiempo de inmersión más adecuado para la propagación *in vitro* de *L. speciosa* evaluando parámetros morfológicos y fisiológico (SPAD).

3. Comparar la eficiencia de la propagación *in vitro* de *L. speciosa* en el SIT contra el cultivo en medio sólido.
4. Evaluar el porcentaje de supervivencia *ex vitro* de las plantas obtenidas por ambos sistemas.

V. MATERIAL Y MÉTODO

1. Material vegetal

Como fuente de explante se emplearon plántulas de dos y tres años de edad de *Laelia speciosa* previamente establecidas y subcultivadas *in vitro* en medio Murashige y Skoog (MS), (1962) al 100% de sus elementos (Aguilar, 2013). Las plántulas se obtuvieron a partir de semillas de cápsulas inmaduras procedentes de la Reserva de la Biosfera “Barranca de Metztitlán”, Hidalgo, México.

2. Instalación del Sistema de Inmersión Temporal (SIT)

a) Materiales

Con base en la literatura se buscaron y obtuvieron los materiales necesarios para la instalación de un SIT, éstos se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Materiales, características y costo para la construcción de un SIT. Total de la inversión \$12,167.10 M.N (pesos mexicanos).

Material	Descripción	Distribuidor	Costo al año 2012
Manguera transparente autoclavable	DI 1/4" DE 3/8"	CTR Scientific	\$497.60
Filtro jeringa	50mm / 0.2 µm	CTR Scientific	\$1,624.50
Conector tipo "T" en espiga de cobre	1/4" X 1/4" X 1/4"	MHE	\$690.00
Conector tipo "L" de cobre	1/4" X 1/4"	MHE	\$180.00
Compresora	2.5HP 22,71L	The Home Depot	\$1,499.00
Filtro de aire	Puerto de 1/4"	SINYC	\$618.00
Electroválvula	110 Volts y puerto 1/4"	SINYC	\$3,729.00
Manguera Industrial transparente	DI 1/4" D.E. 3/8"	Keep Air	\$20.00
Envase de vidrio con tapa de lámina	940 ml	Grupo Pérez	\$196.00
Conector tipo fitting	1/4"	Möller	\$1,044.00
Temporizador digital	8 eventos	Steren	\$1,920.00

Abreviaturas: **DI** (Diámetro interno) **DE** (Diámetro externo) **MHE** (Ferretería: Mangueras, herramientas y empaque)

b) Armado de biorreactores

La construcción de un biorreactor consistió en emplear dos envases de vidrio en forma cilíndrica, uno tiene la función de contener el medio de cultivo, y el otro de contener el material vegetal (Fig. 7). A las tapas de los envases se les realizó dos perforaciones de 10 mm de diámetro a una distancia entre ellos de 3 cm. En las perforaciones se insertaron los conectores (fitting) y se aseguró con empaques de goma (Fig. 8).

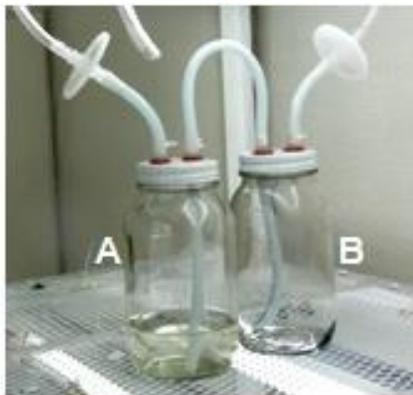


Figura 7. Un biorreactor. (A) Envase con medio de cultivo líquido (B) Envase para el material vegetal.

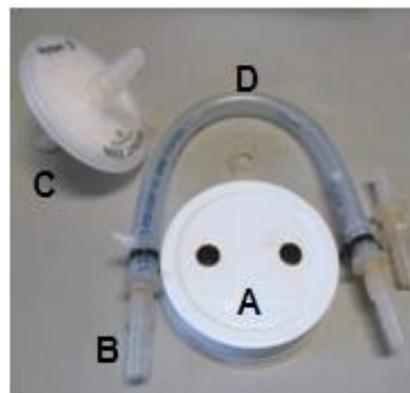


Figura 8. Material para un biorreactor. (A) Tapa de lámina (B) Conector fitting (C) Filtro jeringa (D) Manguera autoclavable.

Para el armado del mismo, se utiliza manguera autoclaveable la cual se coloca en la parte interna de los envases conectándose a los fitting, externamente se coloca una manguera para conectar los envases, y el segundo fitting se conecta a un filtro tipo jeringa (Fig. 8C), esto se realizó para cada biorreactor conformando un total de nueve (Fig. 9).



Figura 9. Sistema de Inmersión Temporal instalado dentro del cuarto de incubación

Los biorreactores se instalaron en estantes dentro del cuarto de incubación, se colocaron tres pares de biorreactores en cada nivel. A cada estante le corresponden dos electroválvulas y cada una está gobernada por un programador de tiempo digital que está conectado a la corriente eléctrica. Las conexiones entre mangueras fueron realizadas usando conectores tipo “T” y “L”.

Al compresor se le añadieron tres filtros: dos de aire y uno de aire lubricador, que se conectaron con niples de cuerda estándar (Fig 10). Una manguera industrial transparente hace llegar el aire hasta las electroválvulas.



Figura 10. Modificaciones al compresor. (A) filtro lubricador. (B) filtros de aire.

3. Determinación de la frecuencia y tiempo de inmersión

Se seleccionaron 45 plántulas *in vitro* de *L. speciosa*, de entre 2 y 3 cm de longitud (Fig. 11) que se inocularon cinco plántulas asépticamente en cada biorreactor, que contenían 250 ml de medio MS líquido al 100% de sus componentes, incluyendo la sacarosa adicionado con BA/ANA 1/2 mg L⁻¹, pH 5.7 (Aguilar, 2013), los cuales fueron esterilizados en una autoclave a 1.5 libras/pulgada² a 120°C durante 18 minutos.



Figura 11. Inóculo inicial. Plántulas de *L. speciosa* de entre 2 y 3 centímetros.

Posterior a la siembra los biorreactores se conectaron al sistema instalado en el cuarto de incubación y se establecieron tres tratamientos, cada uno con tres repeticiones, todos con un tiempo de inmersión de dos minutos.

Tratamiento 1: Frecuencia de inmersión 4 veces al día (cada 6 horas) (FT1)

Tratamiento 2: Frecuencia de inmersión: 6 veces al día (cada 4 horas) (FT2)

Tratamiento 3: Frecuencia de inmersión 8 veces al día (cada 3 horas) (FT3)

A los 30 días se realizó un subcultivo con medio MS basal y se mantuvieron así 30 días más.

Con base en las respuestas morfológicas que presentaron las plántulas se seleccionó la mejor frecuencia de inmersión y se estableció un segundo experimento.

Se seleccionó un lote de 45 plántulas de *L. speciosa*, se inocularon empleando el mismo procedimiento y medio de cultivo anteriormente mencionado. Se les proporcionaron tres tiempos de inmersión cada uno con tres repeticiones.

Tratamiento 1: 2 minutos (IT1)

Tratamiento 2: 4 minutos (IT2)

Tratamiento 3: 6 minutos (IT3)

A los 30 días se realizó un subcultivo con medio MS basal y se mantuvieron así 30 días más.

Finalmente se seleccionó la mejor frecuencia y tiempo de inmersión con base en las características morfológicas de las plántulas y se realizó un tercer experimento, con nueve repeticiones. A los 30 días se realizó un subcultivo con medio MS basal y se mantuvieron así 30 días más.

Para cada uno de los experimentos preliminares se estableció un grupo control, que consistió en plántulas con las mismas características mencionadas anteriormente que se sembraron en medio MS sólido + BA/ANA 1/2 mg L⁻¹. Se colocaron cinco plántulas por frasco conformando nueve repeticiones (45 plántulas).

Todos los cultivos se mantuvieron a 24 ± 2 °C, 16/8 de fotoperiodo e intensidad luminosa de 27 μmol m⁻² s⁻¹.

4. Evaluaciones morfológicas y coeficiente de multiplicación

Después de que concluyeron los respectivos experimentos, para determinar la frecuencia; tiempo de inmersión y la mejor combinación de éstas, se tomaron mediciones de: longitud total de la plántula; longitud de hoja 1 (hoja más larga) y longitud de hoja 2 (hoja más corta); longitud de raíz 1 (raíz más larga) y longitud de raíz 2 (raíz más corta) en centímetros. Ancho en milímetros de hoja 1 y hoja 2 tomados en la parte media de cada hoja.

Se estimó el coeficiente de multiplicación con la siguiente fórmula:

$$CM = \frac{P.F.}{P.I.}$$

Donde **CM**= coeficiente de multiplicación; **P.F.**= número de plántulas finales; **P.I.** número de plántulas iniciales.

Estas evaluaciones se realizaron también en las plántulas obtenidas del cultivo en medio sólido que fue el grupo control.

5. Aclimatización *ex vitro* y porcentaje de supervivencia

Todas las plántulas obtenidas en los tres experimentos y del grupo control, se sembraron en contenedores de plástico con tapa y una mezcla de peat moss, piedra pómez y corteza de *Quercus* 1:1:1 (Aguilar, 2013). Las plántulas permanecieron en el cuarto de incubación y se regaron tres veces a la semana durante 14 días, posteriormente fueron trasladadas al invernadero donde se regaron dos veces a la semana. Durante este proceso la apertura de la tapa de los contenedores fue de manera gradual.

Durante el proceso de aclimatización se registraron los niveles relativos de clorofila en unidades SPAD, esto se llevó a cabo con un SPAD-502 marca Minolta. Las mediciones consistieron en colocar las pinzas del aparato en cada una de las hojas a una altura media, éstas se realizaron a los 14, 40 y 60 días.

Después de cuantificar la clorofila, se realizaron conteos de las plántulas que permanecían vivas y se obtuvo el porcentaje de supervivencia mediante la siguiente ecuación:

$$PS = \frac{P.V.}{P.I.}$$

Donde: **PS**= Porcentaje de supervivencia; **P.V.**= número de plántulas vivas **P.I.**= número de plántulas iniciales.

6. Análisis estadísticos

Se evaluaron los parámetros de longitud total de la planta, longitud y ancho de hoja, longitud de raíz y niveles relativos de clorofila en unidades SPAD, de las plántulas provenientes del SIT y medio sólido. Los análisis fueron ANOVA de una vía con comparación múltiple Tukey y prueba t de student para muestras independientes. Previo a los análisis se comprobó la normalidad de los datos. Posteriormente se comprobaron los supuestos de cada prueba, con el fin de

identificar diferencias estadísticamente significativas. Lo anterior se realizó con el paquete estadístico SPSS Statistics 17.0.

VI. RESULTADOS

1. Instalación del SIT

Se logró instalar un SIT que constituyó de tres biorreactores por nivel de estante, los biorreactores estaban interconectados entre sí como se explicó en el apartado de armado de biorreactores. De cada biorreactor, un frasco contenía el medio de cultivo y el otro los explantes, estos se conectaron a su vez a una serie de mangueras que conducen el aire filtrado a presión generado por la compresora. La apertura y cierre del paso del aire para desplazar el medio de cultivo y bañar los explantes se realizó a través de unas electroválvulas gobernadas por un temporizador digital (Fig. 12).

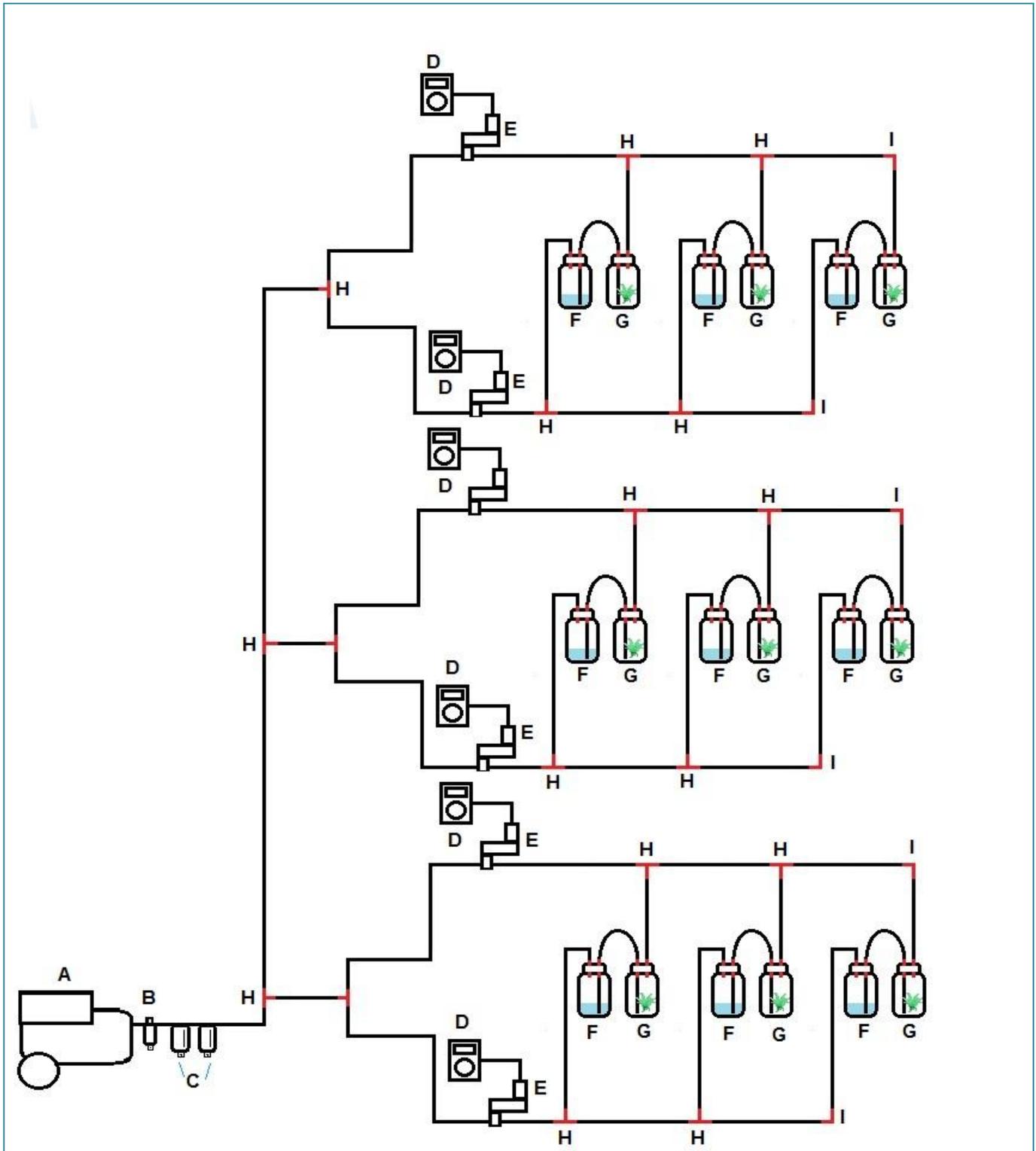


Figura 12. Diagrama general del SIT. Compresor (A) filtro lubricador (B) filtros de aire (C) programador de tiempo (D) electroválvula (E) envase para el medio (F) envase para cultivo (G) conector "T" (H) Conector "L" (I).

2. Determinación de la frecuencia y tiempo de inmersión

A) Datos morfológicos

Se pudo observar el evidente desarrollo y crecimiento en general de las plantas sometidas al SIT que aquellas que permanecieron en medio sólido. Las hojas presentaron un mejor aspecto craso, mayor talla, color verde y desarrollo de raíces.

a) Evaluación de la frecuencia de inmersión

En la cuantificación de los datos morfológicos se observó que el tratamiento 2 con la frecuencia de 6 veces al día (FT2) fue el que registró la mayor longitud total 6.24 cm, longitud de hojas (2.09 – 3.48 cm), de raíces (1- 1.6 cm) así como del ancho de la hoja (4.6- 5.35 mm) (Fig. 13).

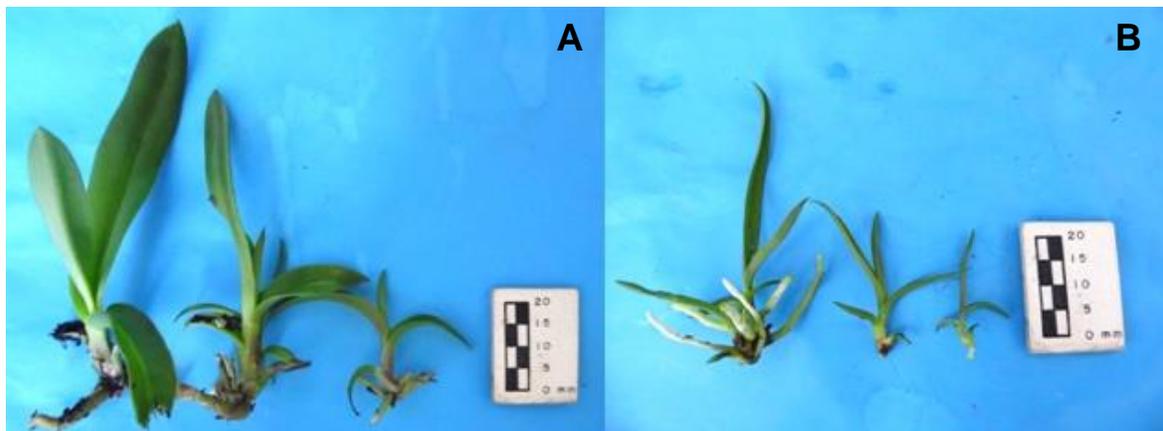


Fig. 13. Plántulas de *L. speciosa* obtenidas a diferentes frecuencias de inmersión. Comparación de tallas en el mejor tratamiento TF2 (A), y tratamiento control FT0 (B).

Le siguieron la frecuencia de 8 veces al día (FT3) y la frecuencia de 4 veces al día (FT1) con valores muy similares entre sí y finalmente las plántulas provenientes del medio sólido (FT0) registraron los valores más bajos de todos los parámetros evaluados.

En cuanto a la raíz, se observó que no todas las plántulas la desarrollaron y del total de plántulas evaluadas, el 91.91% presentaron una raíz más larga (R1) y el 69.78% una raíz corta (R2).

El análisis estadístico mostró diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos (Tabla 3).

Tabla 3. Promedios de datos morfológicos y error estándar (ES) obtenidos de la propagación *in vitro* de *Laelia speciosa* con diferentes frecuencias de inmersión. Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$).

	FT0 ± ES	FT1± ES	FT2± ES	FT3± ES
Long. total	2.92±0.09c	4.50±0.31b	6.24±0.33a	4.93±0.31b
Long. de hoja 1	1.69±0.07c	2.64±0.27b	3.48±0.22a	2.82±0.22b
Long. de hoja 2	1.16±0.04c	1.70±0.21b	2.09±0.13a	1.65±0.10b
Long. de raíz 1	1.10±0.05b	1.22±0.14b	1.63±0.11a	1.30±0.07b
Long. de raíz 2	0.90±0.04a	0.78±0.07a	1.04±0.08a	1.02±0.07a
Ancho de hoja 1	1.25±0.06c	4.19±0.58b	5.35±0.37a	4.91±0.43ab
Ancho de hoja 2	1.17±0.05c	2.91±0.43b	4.66±0.30a	2.85±0.26b

Abreviaturas: **FT0** (Control) **FT1** (4 veces al día) **FT2** (6 veces al día) **FT3** (8 veces al día).

b) Evaluación del tiempo de inmersión

Con respecto a los tiempos de inmersión evaluados, los datos morfológicos muestran que con el tiempo de inmersión de 4 minutos (IT2) se obtuvieron plántulas con la mayor longitud total 4.61 cm, longitud de hojas (1.98-2.81cm), de raíces (0.88 – 1.10 cm) y el ancho de las hojas (4.94 – 5.51 mm). Le siguieron el tiempo de inmersión de 6 minutos (IT3) y el tiempo de inmersión de 2 minutos (IT1) con valores muy similares entre sí. Las plántulas provenientes del medio sólido (IT0) registraron los valores más bajos de todos los parámetros evaluados (Fig. 14). Al igual que en el ensayo anterior no todas las plántulas generaron raíces, del total evaluado el 62.24% poseían raíz larga (R1) y el 33.08% raíz corta (R2).

El análisis estadístico mostró diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos (Tabla 4).

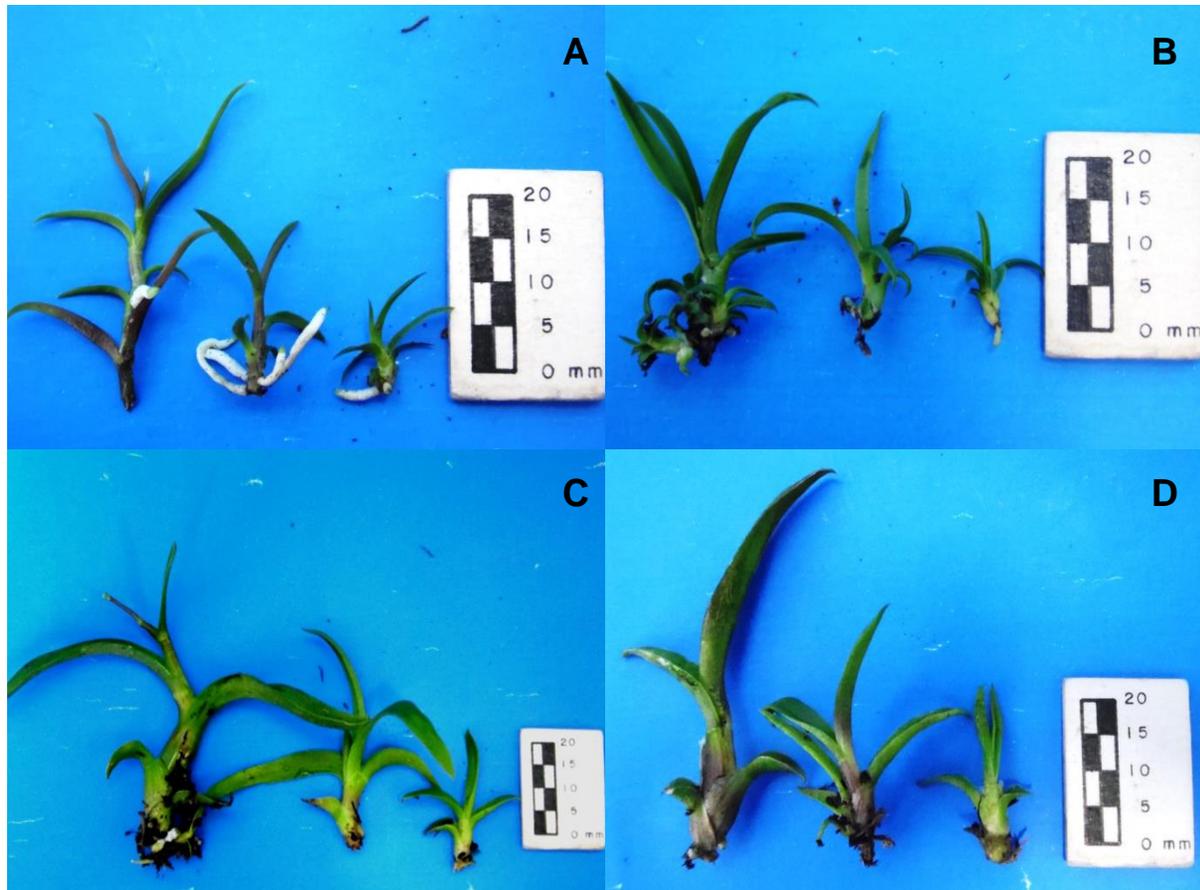


Fig. 14. Plántulas de *L. speciosa* obtenidas a diferentes tiempos de inmersión. Comparación de tallas en plántulas obtenidas en IT0 (A) Plántulas obtenidas en IT1 (B) Plántulas obtenidas en IT2 (C) Plántulas obtenidas en IT3 (D).

Tabla 4. Promedios de datos morfológicos y error estándar (ES) obtenidos de la propagación *in vitro* de *Laelia speciosa* con diferentes tiempos de inmersión. Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$).

	IT0± ES	IT1± ES	IT2± ES	IT3± ES
Long. total	2.04±0.07c	3.12±0.17b	4.61±0.35a	3.34±0.30b
Long. de hoja 1	1.03±0.05c	1.84±0.13b	2.81±0.28a	1.81±0.18b
Long. de hoja 2	0.74±0.03c	1.34±0.12b	1.98±0.23a	1.32±0.17b
Long. de raíz 1	0.63±0.04b	0.82±0.08ab	1.10±0.12a	0.96±0.12a
Long. de raíz 2	0.51±0.05b	0.66±0.07ab	0.88±0.08a	0.50±0.11b
Ancho de hoja 1	0.90±0.04c	1.94±0.19b	5.51±0.45a	2.88±0.54b
Ancho de hoja 2	0.88±0.06c	1.36±0.14c	4.94±0.49a	2.62±0.39b

Abreviaturas: **IT0** (Control) **IT1** (2 minutos de inmersión) **IT2** (4 minutos de inmersión) **IT3** (6 minutos de inmersión).

B) Coeficiente de multiplicación

a) Evaluación de la frecuencia de inmersión

Al evaluar las distintas frecuencias de inmersión se observó un efecto en el coeficiente de multiplicación (Fig. 15). El más alto se registró con la frecuencia de 6 veces al día (FT2) con 3.33, las plántulas se observaron vigorosas, con un color verde intenso, tallos gruesos, raíces desarrolladas y hojas gruesas. Seguido de la frecuencia de 8 veces al día (FT3), las cuales poseían un aspecto similar a las anteriores, sin embargo, en estas el color era más pálido. El grupo control presentó raíces, hojas y tallos delgados, coeficiente de multiplicación 2.40.

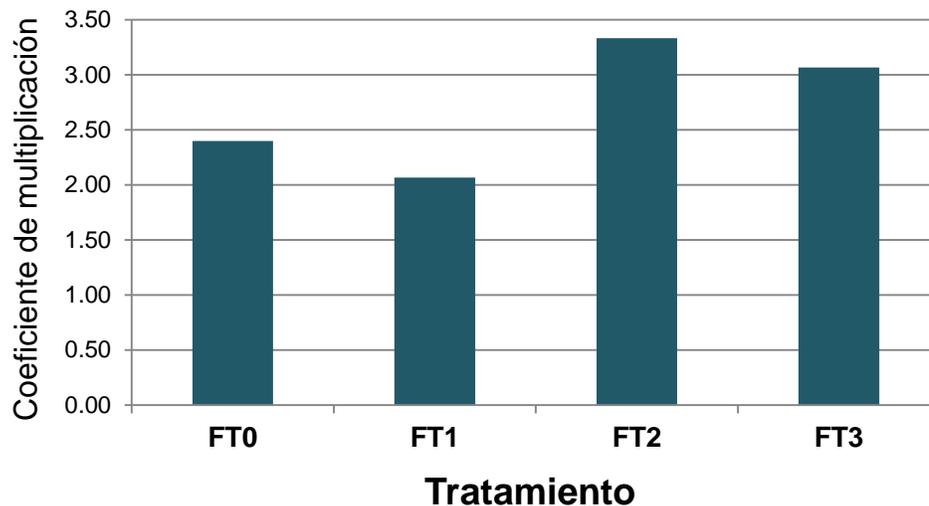


Fig. 15. Efecto de las diferentes frecuencias de inmersión en el coeficiente de multiplicación de plántulas de *L. speciosa*. Abreviaturas: **FT0** (Control) **FT1** (4 veces al día) **FT2** (6 veces al día) **FT3** (8 veces al día).

b) Evaluación del tiempo de inmersión

Los diferentes tiempos de inmersión tuvieron un efecto en el coeficiente de multiplicación (Fig. 16). Se observó que con un tiempo de inmersión de 4 minutos (IT2) se obtuvo el mayor coeficiente de multiplicación (2.3), seguidos de los tiempos con 2 minutos (IT1) y 6 minutos (IT3) ambos con un coeficiente de 2 y finalmente el control (IT0) con 1.5. Plántulas obtenidas en los tiempos de inmersión más prolongados (IT2 e IT3) en general, presentaron un verde pálido,

en algunas zonas incluso tenían colores de morado a negro. Plántulas provenientes del menor tiempo de inmersión (IT1) mostraron mayor vigor, colores sin signos de palidez, un buen desarrollo de hojas, tallos y raíces. Plántulas obtenidas en el tratamiento control (IT0) se observaron con tallos, hojas y raíces más delgadas y frágiles.

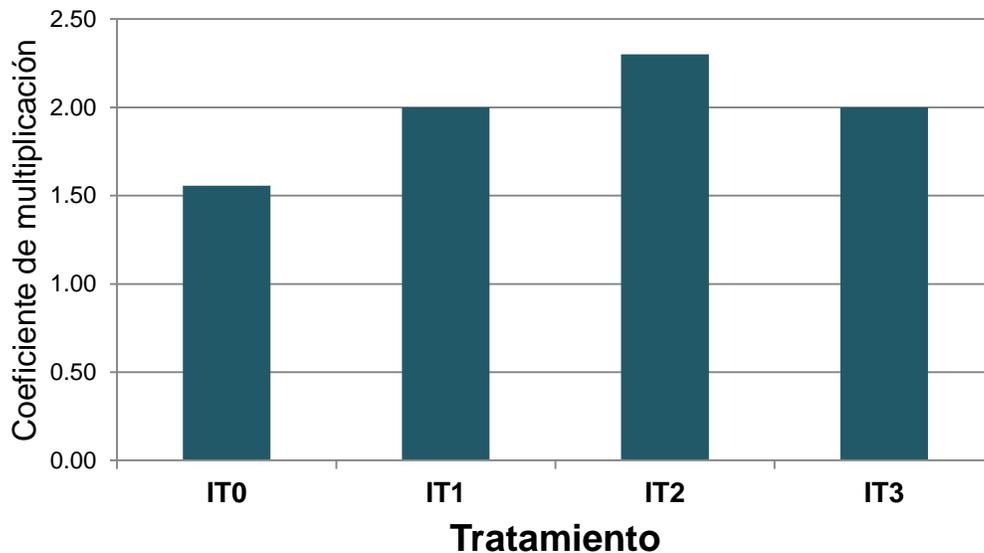


Fig. 16. Efecto de los diferentes tiempos de inmersión en el coeficiente de multiplicación de plántulas de *L. speciosa*. Abreviaturas: **IT0** (Control) **IT1** (2 minutos de inmersión) **IT2** (4 minutos de inmersión) **IT3** (6 minutos de inmersión).

C) Aclimatización *ex vitro*

La aclimatización *ex vitro* fue favorable, ya que permitió la supervivencia de las plántulas en condiciones de invernadero durante 60 días y evaluar la cantidad de clorofila a lo largo de este proceso.

a) Evaluación de la frecuencia de inmersión

Al evaluar las plántulas provenientes de las diferentes frecuencias de inmersión, se observó que los niveles relativos de clorofila más altos registrados en unidades SPAD a los 14, 40 y 60 días en condiciones *ex vitro* los de la frecuencia de 6 veces (FT2) con promedios de 42 unidades a los 14 días, con un incremento de 45 a los 40 días y posteriormente con un decremento a 43 unidades a los 60 días y no presentaron diferencias estadísticamente significativa a lo largo del proceso. En

este tratamiento, las plántulas desde un principio mostraron buen desarrollo y no se observó necrosis en los tejidos, además, las raíces al finalizar el experimento eran de mayor tamaño en comparación de un inicio. Seguidas de las frecuencias de 4 veces (FT1), en donde se observó que durante su aclimatización a los 14 y 40 días los niveles de clorofila se mantuvieron uniformes con 30 y posteriormente decayó a los 60 días hasta 25 unidades, las plantas mostraron una coloración verde pálido y sus hojas presentaron síntomas de necrosis en la zona apical, en especial aquellas que poseían mayor talla. Con una frecuencia de 8 veces (FT3) el valor inicial a los 14 días fue de 35 unidades, decrece a niveles de 27 a los 40 días y posteriormente se incrementa a las 32 unidades.

En el grupo control los valores iniciales a los 14 días son los más bajos (13 Unidades) aunque presentaron hojas delgadas, se observó un incremento paulatino a lo largo del tiempo alcanzando valores similares o cercanos a los de la frecuencia de 4 veces (FT1) a los 60 días (Fig. 17).

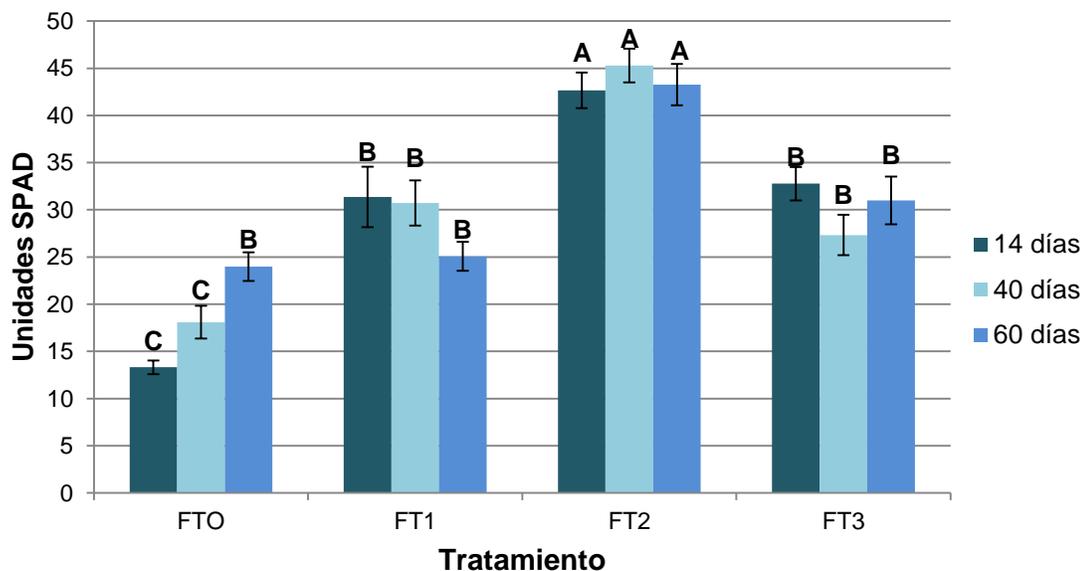


Figura 17. Unidades SPAD promedio de plántulas de *L. speciosa* provenientes de diferentes frecuencias de inmersión. Lecturas realizadas a los 14, 40 y 60 días en condiciones *ex vitro*. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.00$) Abreviaturas: **FT0** (Control) **FT1** (4 veces al día) **FT2** (6 veces al día) **FT3** (8 veces al día).

b) Evaluación del tiempo de inmersión

De las plántulas procedentes de los diferentes tiempos de inmersión y establecidas en condiciones *ex vitro* se observó que las unidades SPAD promedio registradas más altas se obtuvieron en el tiempo de inmersión de 4 minutos (IT2) con un valor de 29 unidades a los 14 días, con un posterior incremento a los 40 días (31 unidades) y luego un decremento de 27 unidades a los 60 días, en un inicio las plántulas se observaron con buen vigor, sin embargo, al transcurrir el tiempo de aclimatización, se observaron zonas de necrosis que comenzaron en la zona apical de las hojas posteriormente los tallos perdían vigor. Los valores más uniformes se presentaron en el tiempo de inmersión de 2 minutos (TI1), a lo largo del periodo de aclimatización, presentó valores de entre 24 unidades SPAD las plántulas se observaron con un verde más intenso, no se observaron signos de necrosis, el vigor se mantuvo estable a lo largo de la aclimatización. El tiempo de inmersión de 6 minutos (IT3) es el que presenta a los 14 días valores de 27, pero posteriormente van decreciendo estos valores hasta 18 unidades a los 60 días en condiciones *ex vitro*. Se observó que las hojas rápidamente perdían vigor a lo largo del tiempo de aclimatización al punto de marchitarse. Los valores más bajos (entre 12 y 14 unidades) se registraron en las plántulas procedentes del medio sólido (IT0).

Los análisis estadísticos no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos con el SIT, (Fig. 18).

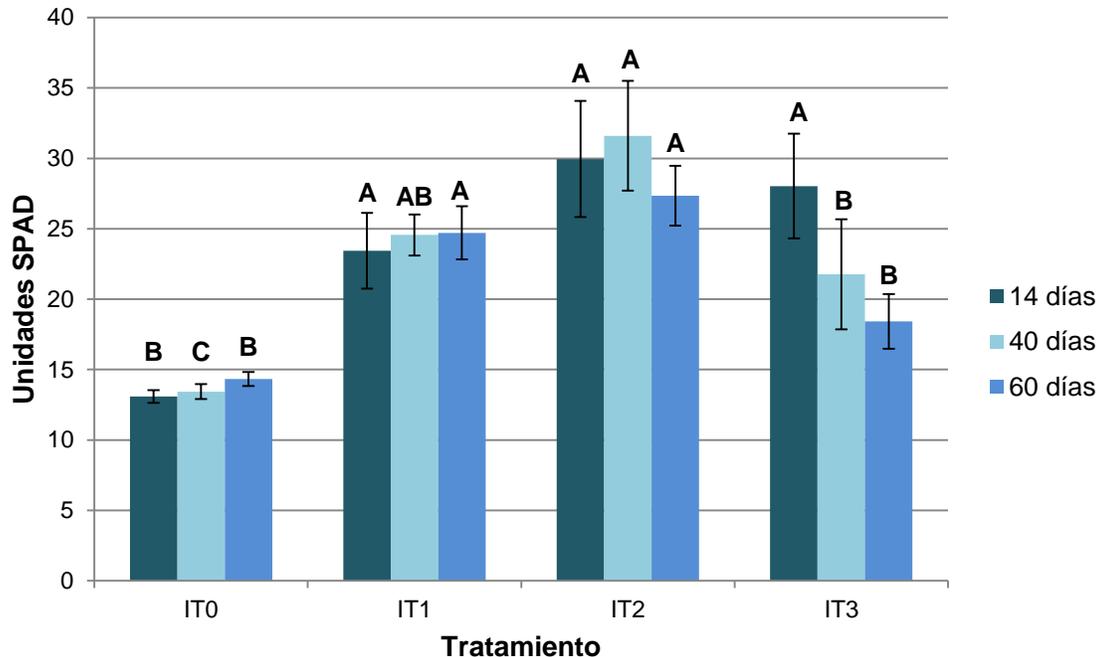


Figura 18. Unidades SPAD promedio de plántulas de *L. speciosa* provenientes de diferentes tiempos de inmersión. Lecturas realizadas a los 14, 40 y 60 días en condiciones *ex vitro*. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.00$). Abreviaturas: **IT0** (Control) **IT1** (2 minutos de inmersión) **IT2** (4 minutos de inmersión) **IT3** (6 minutos de inmersión).

Cabe mencionar que a lo largo del tiempo de aclimatización no todas las hojas fueron medidas por el SPAD, pues en algunos casos éstas eran demasiado pequeñas y el SPAD no detectaba la superficie de la hoja, en el experimento frecuencia de inmersión a los 14, 40 y 60 días se tomaron datos del 71, 81 y 73% del total de plántulas obtenidas.

En el experimento de tiempo de inmersión a los 14, 40 y 60 días, se midieron el 66, 80 y 87% del total de plántulas, como ya se mencionó en los tratamientos (IT2 e IT0) las hojas presentaron a lo largo de este tiempo, pérdida de vigor, y posteriormente se marchitaban, esto quizás explique porque los valores SPAD disminuyeran.

D) Supervivencia *ex vitro*

a) Evaluación de la frecuencia de inmersión

Las plántulas que procedían de las diferentes frecuencias de inmersión mostraron porcentajes de supervivencia similares a los 14 días (88 a 90%), posteriormente este porcentaje fue decayendo tanto en la frecuencia de 4 veces (FT1) como en el grupo control (FT0) hasta alcanzar valores del 38% y 59% a los 60 días respectivamente. Los porcentajes más altos se obtuvieron en las plántulas procedentes de la frecuencia de 6 veces (FT2) y 8 veces (FT3) con 90 y 88% respectivamente a los 14 días, el porcentaje de supervivencia decayó hasta el 70% en el tratamiento (FT3) y en un 80% en FT2 (Fig. 19) siendo este último el mejor resultado, a lo largo del tiempo de aclimatización no se observaron signos de necrosis ni pérdida de vigor (Fig. 20). En los tratamientos FT2 y FT3, aunque no se observó un incremento en sus tallas, las raíces mostraron un buen desarrollo, además, al finalizar el experimento éstas ya habían desarrollado el velamen. Plántulas del tratamiento FT1 fueron las que perdían vigor empezando por las hojas, posteriormente los tallos colapsaban y moría la planta. Plántulas provenientes del tratamiento control, eran pequeñas y frágiles con un escaso desarrollo de raíces.

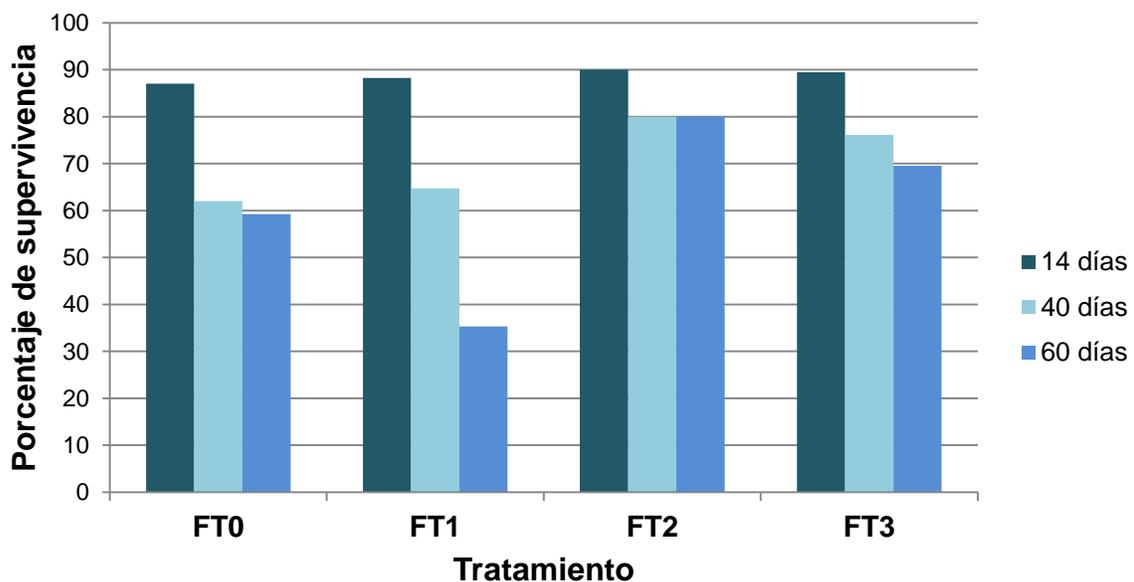


Figura 19. Porcentajes de supervivencia *ex vitro*, a los 14, 40 y 60 días de plántulas de *L. speciosa* provenientes de diferentes frecuencias de inmersión. Abreviaturas: **FT0** (Control) **FT1** (4 veces al día) **FT2** (6 veces al día) **FT3** (8 veces al día).



Fig. 20. Plántulas de *L. speciosa* obtenidas a diferentes frecuencias de inmersión en la fase *ex vitro*.

b) Evaluación del tiempo de inmersión

Los mejores porcentajes de supervivencia de las plántulas provenientes de los diferentes tiempos de inmersión a los 14 días se presentaron en el tiempo de inmersión de 2 minutos (IT1), seguido del grupo control (IT0) y del tiempo de inmersión de 4 minutos (IT2) con 91, 90 y 90 % respectivamente, el valor más bajo lo presentó el tiempo de inmersión de 6 minutos (IT3) con 75%. Posteriormente se observó un decremento de la supervivencia a los 40 y 60 días tanto en el grupo control (IT0), como en el tiempo de inmersión de 4 minutos (IT2) que va del 85 al 78% en el primero y del 72 al 69% en el segundo. El tiempo de inmersión de 6 minutos (IT3) es el que presentó los valores más bajos ya que a los 60 días el porcentaje de supervivencia es del 55%. Plántulas provenientes del tratamiento IT1 aunque con tallas menores en comparación con IT2 presentaron buen desarrollo en el tiempo de aclimatización, las hojas y tallos mantuvieron un color verde intenso, y aunque no se observó un marcado crecimiento, el desarrollo de las raíces fue favorable. Plántulas del tratamiento IT2 e IT3 presentaron una rápida pérdida de vigor, las hojas y posteriormente los tallos colapsaban (Fig. 21) y (Fig.22).

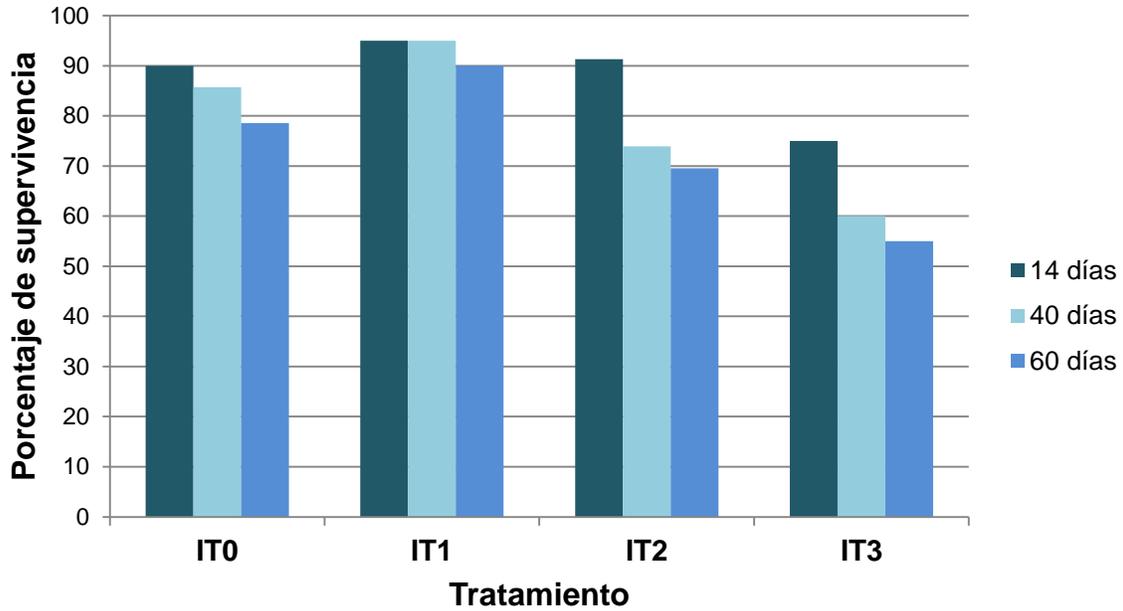


Figura 21. Porcentajes de supervivencia *ex vitro*, a los 14, 40 y 60 días de plántulas de *L. speciosa* provenientes de diferentes tiempos de inmersión. Abreviaturas: **IT0** (Control) **IT1** (2 minutos de inmersión) **IT2** (4 minutos de inmersión) **IT3** (6 minutos de inmersión).

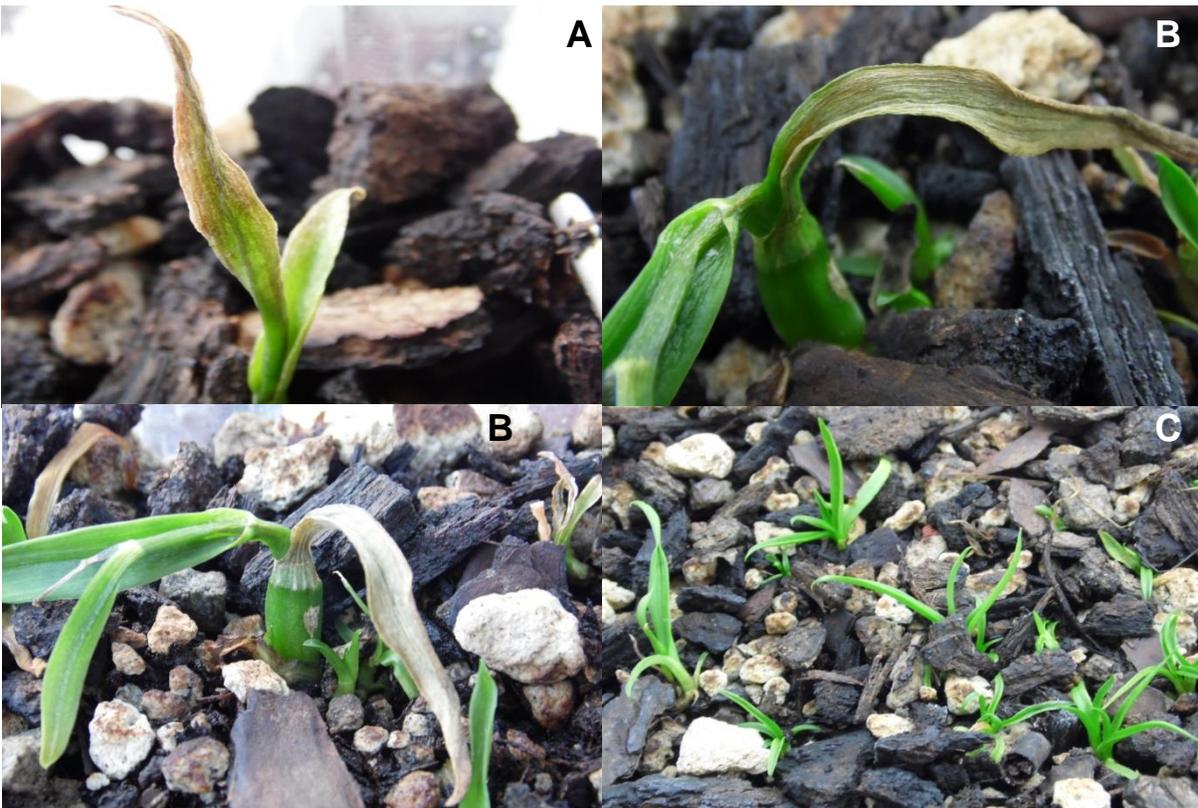


Figura 22. Plántulas de *L. speciosa* obtenidas a diferentes tiempos de inmersión en fase *ex vitro*. Plántulas obtenidas en IT3 (A), IT2 (B) e IT1 (C).

3. Frecuencia y tiempo de inmersión determinadas

Con base en los anteriores resultados se seleccionó una frecuencia de 6 veces al día y 2 minutos de inmersión, como grupo control se sembraron plántulas en medio sólido.

a) Datos morfológicos

Se obtuvieron mayores promedios en todos los parámetros evaluados en plántulas provenientes del SIT, con longitud total de 4 cm, hojas de entre 1.5 y 2 cm, raíces de 1 y 1.2 cm, ancho de hojas de 2.8 y 3.5 mm. En comparación con las obtenidas en el cultivo en medio sólido (S) (Tabla 5). Plántulas obtenidas en el SIT se observaron con buen vigor, hojas y tallos gruesos y un color verde intenso sin signos de zonas pálidas (Fig. 23 A); no se presentó clorosis en ninguna de ellas, en comparación con los anteriores experimentos, las raíces eran más desarrolladas, incluso algunas con velamen. Las plántulas obtenidas en el tratamiento control (Fig. 23 B), se mostraron más débiles con tallos, hojas y raíces más delgadas, pero sin signos de clorosis (Fig. 23 C1 C2 y C3).

No todas las plántulas desarrollaron raíz, del total evaluado el 93.39% generaron raíz larga (R1) y el 66.50% raíz corta (R2).

Tabla 5. Promedios de los parámetros morfológicos y error estándar (ES) medidos de las plantas propagadas *in vitro* de *Laelia speciosa* en un Sistema de Inmersión Temporal (SIT) y en medio sólido (S)

	SIT ± ES	S ± ES
Long. total	4.09±0.12	2.58±0.08
Long. de hoja 1	2.11±0.08	1.16±0.75
Long. de hoja 2	1.44±0.07	0.75±0.04
Long. de raíz 1	1.24±0.07	1.01±0.06
Long. de raíz 2	0.98±0.07	0.76±0.07
Ancho de hoja 1	3.50±0.16	1.33±0.06
Ancho de hoja 2	2.79±0.11	1.15±0.05

Al comparar los coeficientes de multiplicación se obtuvo 3 en el Sistema de Inmersión Temporal y en el medio sólido 1.71 (Fig. 24). Estos valores son semejantes a los que se obtuvieron en los mejores tratamientos al evaluar la frecuencia y tiempo de inmersión por separado, ya que poseían los mismos tiempos de frecuencia e inmersión, por lo que no se presentó un incremento significativo.

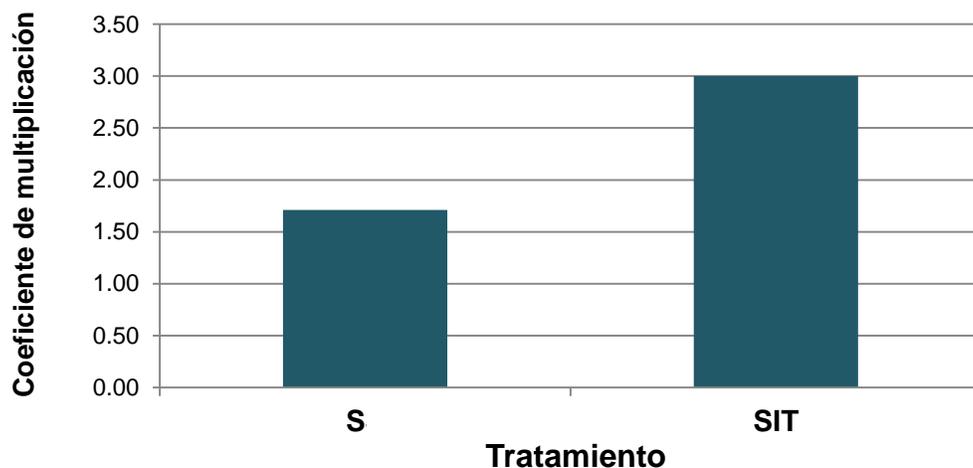


Figura 24. Coeficiente de multiplicación de plántulas de *L. speciosa* obtenidos en dos sistemas de cultivo *in vitro*. Abreviaturas: **S** (Medio sólido) **SIT** (Sistema de Inmersión Temporal).

b) Aclimatización y supervivencia *ex vitro*

Las plántulas siguieron el proceso de aclimatización y las unidades SPAD más altos a los 14 y 40 días se obtuvieron en plántulas provenientes del SIT con promedios de 32 y 34 en comparación con las obtenidas en medio sólido con 16 y 17. Las plántulas obtenidas mediante el SIT, no mostraron signos de pérdida de vigor a los largo del tiempo de aclimatización, al igual que en los anteriores resultados, no se observó un notable crecimiento, sin embargo, las raíces se desarrollaron de manera favorable. Las zonas necróticas en el ápice de las hojas no se observaron en este experimento, las hojas y tallos mantuvieron un buen color verde intenso (Fig. 22 D). En el tratamiento control las plántulas eran mucho

más delgadas, las hojas eran frágiles pero desarrollaron un buen tamaño de raíz, aunque más delgados que los obtenidos en el SIT.

No todas las hojas fueron medidas por el SPAD, pues en algunos casos éstas eran demasiado pequeñas y el aparato no detectaba la superficie de la hoja, se tomaron datos del 88.2% y 83.33% del total de las plántulas (Fig. 25).

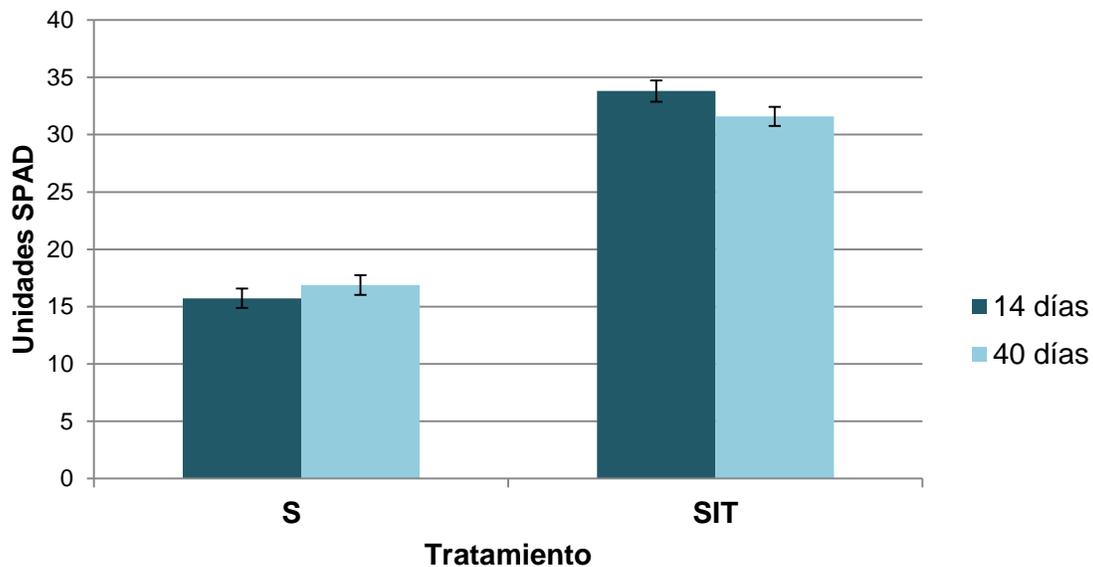


Figura 25. Unidades SPAD a los 14 y 40 días de plántulas de *L. speciosa* obtenidas en ambos sistemas de cultivo *in vitro*. Abreviaturas: **S** (Medio sólido) **SIT** (Sistema de Inmersión Temporal).

El porcentaje de supervivencia más alto se obtuvo en plántulas provenientes del SIT a los 14 y 40 días con 96 y 87% en comparación con las obtenidas en medio sólido con 91 y 74% (Fig. 26).

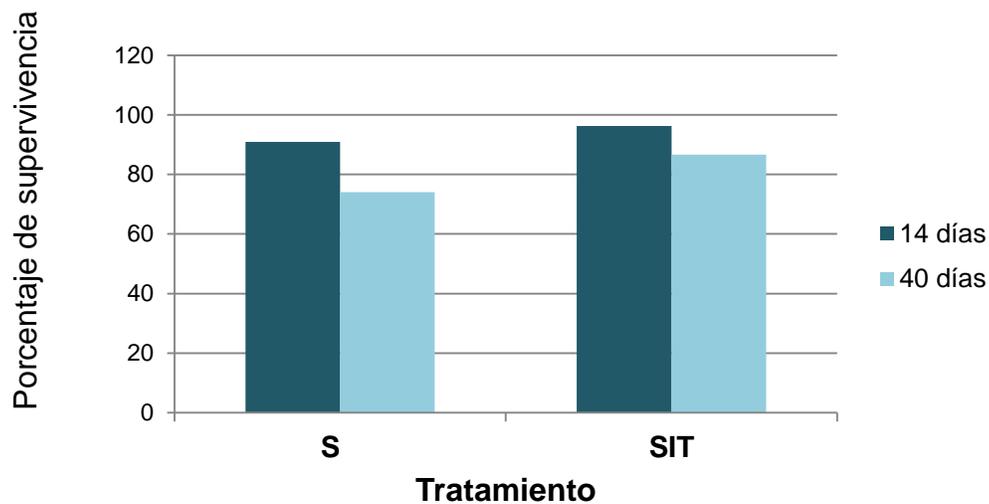


Figura 26. Porcentaje de supervivencia a los 14 y 40 días *ex vitro*, de plántulas de *L. speciosa* obtenidas en ambos sistemas de cultivo *in vitro*. Abreviaturas: **S** (Medio sólido) **SIT** (Sistema de Inmersión Temporal).

concentraciones de medio MS, tiene una influencia en el desarrollo y multiplicación de plántulas de *L. speciosa*. Se obtuvieron plántulas con mayores promedios en los parámetros morfológicos, en las unidades SPAD y la supervivencia *ex vitro* (Fig. 22).

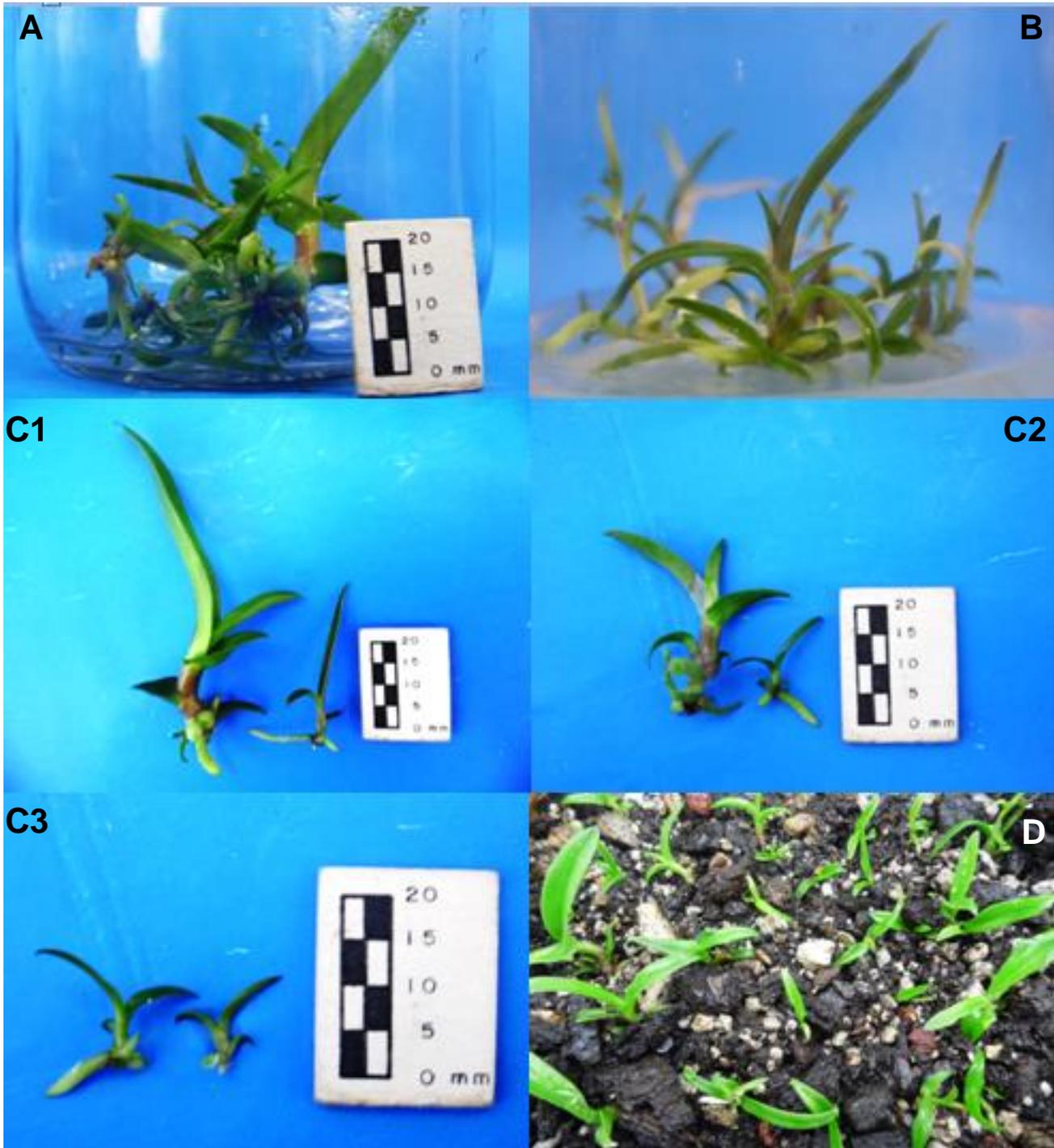


Fig. 22. Plántulas de *L. speciosa* obtenidas en SIT y cultivo *in vitro* tradicional medio sólido. Plántulas obtenidas en SIT (A) Plántulas en SS (B) Comparación de plántulas en ambos sistemas a la izquierda provenientes del SIT y derecha plántulas en S, plántulas con mayores tallas (C1) media talla (C2) y menor talla (C3) Aclimatización de plántulas obtenidas en SIT (D).

VII. DISCUSIÓN

Se logró instalar un sistema de inmersión temporal con materiales de bajo costo y fácil acceso, y una inversión total de \$12,167.10 M.N. Un sistema similar con recipientes manufacturados comercialmente como los RITA, incrementa notablemente el costo ya que cada uno de ellos tiene un precio de \$2,500 M.N. aproximadamente, si se consideran por lo menos nueve de estos, el costo sería de \$22,500, sin contemplar el resto de la instalación, lo cual serían \$10,000 más.

Cabe mencionar que a pesar de la notable cantidad de trabajos en los cuales se ha instalado un tipo de SIT (Tisserat y Vandercook, 1985; Aitken-Christie y Davies, 1988; Simonton *et al.*, 1991; Teisson y Alvarad, 1995; Escalona *et al.*, 1999) en ninguno se menciona el tipo de material específico que se debe emplear o dónde adquirirlo y qué metodología se debe seguir para construir dicha biotecnología. Si bien en algunos casos se describe el funcionamiento del sistema, y el material, pero sin especificaciones. Cuando se monta un SIT los materiales se deben ajustar a lo que ofrece el comercio nacional.

Como se describió anteriormente, las variables de frecuencia y tiempo de inmersión tuvieron un efecto en el desarrollo de *L. speciosa*, como mencionan Berthouly y Etienne, (2005) su determinación exacta es la clave del éxito al establecer protocolos de propagación *in vitro* empleando un tipo de sistema de inmersión temporal. Estas variables afectan de manera significativas en los parámetros tales como la mejora en la calidad del material vegetal, producir un incremento en el vigor de los brotes o en el desarrollo de las plántulas y reducción en la hiperhidratación (Teisson y Alvarad, 1995; Ziv, 2005).

La influencia de la aplicación de diferentes frecuencias de inmersión sobre el desarrollo de las especies vegetales está demostrada en trabajos como Rivero *et al.* (2004) los cuales al propagar *in vitro* el lirio flamingo (*Anthurium andraeanum*), evaluaron frecuencias de inmersión de 4 y 6 veces por día, se obtuvieron mayores promedios en el coeficiente de multiplicación con 17.63, y altura de la plántula de 1.44 cm con una frecuencia de seis veces al día (cada 4 horas), al igual que la

mejor frecuencia del presente trabajo, además las plántulas presentaron mayor vigor y mayores tallas en comparación con una frecuencia de cuatro veces al día, y no se reportan anomalías fisiológicas como la hiperhidratación. Por su parte Vilchez *et al.* (2011) en la propagación *in vitro* de la oreja de elefante (*Xanthosoma sagittifolium*) obtuvieron promedios superiores en cuanto a peso fresco con 3.24, altura de la plántula con 5.69, y número de brotes promedio con 15.27 en una frecuencia de inmersión de 6 veces al día, en comparación con una frecuencia de 3 veces al día.

Como se observó en los resultados, la frecuencia de inmersión más espaciada 4 veces al día (cada 6 horas) y la más corta 8 veces al día (cada 3 horas) en general tanto en lo morfológico como en lo fisiológico, resultaron en promedios más bajos en comparación con una frecuencia media 6 veces al día (cada 4 horas), esta situación se asemeja a lo que se obtuvo en la micropropagación de la sábila (*Aloe vera*) con frecuencias de 2, 3 y 4 veces al día, los mejores resultados se obtuvieron en la frecuencia media, en parámetros como, número de brotes por explante y longitud del explante con 2.75 y 6.04 cm respectivamente (Vilchez *et al.*, 2007). En la micropropagación de la banana (*Musa* sp. Var. FHIA-01) (Posada *et al.*, 2003) se evaluaron frecuencias de 2, 3 y 4 veces al día, se obtuvo el mayor coeficiente de multiplicación (5.0) en la frecuencia media (3 veces al día) en comparación con las restantes frecuencias con 3.5 y 1.8 en promedio respectivamente, además con la mejor frecuencia se lograron obtener plantas con mayor vigor, y un color verde más intenso de las hojas.

En cuanto a la propagación *in vitro* de orquídeas mediante un SIT, en el trabajo de Tirado *et al.* (2005) a partir de protocormos de *Phanopsis*, obtuvieron 8.2 protocormos como coeficiente de multiplicación con una frecuencia de 6 veces al día, en comparación con una frecuencia de 3 veces al día con 1.83 protocormos. Otros trabajos en los que se ha propagado la misma orquídea están los descritos por Park *et al.* (2000) los cuales usaron una frecuencia espaciada de 12 veces al día obteniendo un coeficiente de multiplicación de 18 a partir de PLB's (protocorm-like bodies). Por su parte Hempling y Preil (2005) usaron una frecuencia de 8

veces al día obteniendo 25.0 en promedio de coeficiente de multiplicación. Cabe mencionar que estos dos últimos trabajos no evaluaron diferentes frecuencias de inmersión.

La frecuencia de inmersión influye de manera significativa en la renovación de la atmósfera interna del frasco de cultivo permitiendo un mayor o menor intercambio gaseoso, así como en la disponibilidad y asimilación por el material vegetal del medio de cultivo (Bertouly y Etienne, 2005). Los mejores resultados obtenidos con una frecuencia de inmersión de 6 veces al día, pueden deberse a lo que explica Santos *et al.* (2011) en relación a que se logra una renovación más sistemática de los gases que conforman la atmósfera interna del frasco de cultivo, el suministro de nutrientes se favoreció debido a que probablemente el contacto del medio líquido fue más adecuado, lo cual contribuye a tener plántulas de mayor calidad. En la frecuencia de inmersión más corta, es decir, 8 veces al día (cada 3 horas) las frecuentes renovaciones provocaron un aumento en la concentración de oxígeno en el interior del recipiente, ocasionando un inadecuado intercambio gaseoso. En cambio en la frecuencia de inmersión más espaciada 4 veces al día (cada 6 horas) los promedios más bajos quizás obedecen simplemente a una escasa disponibilidad de nutrientes.

En la literatura consultada no se encontraron trabajos en los cuales se evalúe la supervivencia *ex vitro* en plántulas provenientes con diferentes frecuencias de inmersión. En el presente trabajo se observó que las diferentes frecuencias de inmersión aplicadas tuvieron un efecto en los porcentajes de supervivencia *ex vitro*, aún teniendo el mismo procedimiento de aclimatización. Se observó que en plántulas con la mejor calidad y tallas más grandes, se garantizó una buena supervivencia *ex vitro*. Esto quizás se deba a que tenían una buena formación de raíces, lo que le permitió una buena absorción de nutrientes. Porcentajes de supervivencia más bajos en los otros dos tratamientos quizás se deba a que la frecuencia juega un papel importante en el intercambio gaseoso, relaciones hídricas, obtención de los nutrientes y en la renovación de la atmósfera interna del

vaso (Teisson y Alvarad, 1995; Berthouly y Ethienne, 2005; Ziv, 2005). Ante este panorama es probable que en los diferentes tratamientos las plántulas estaban adecuadas a diferentes condiciones físicas, probablemente en plántulas obtenidas con frecuencias más cortas, sufrieron un estrés en la fase *ex vitro*, debido a que estaban adecuadas a una obtención de agua y nutrientes más constantes. Un posterior tratamiento de aclimatización personalizado a cada variable de frecuencias de inmersión, probablemente asegure una mejor supervivencia *ex vitro*.

E3 El tiempo de inmersión varía considerablemente entre las diferentes especies, el papel fundamental del tiempo de inmersión en el empleo de sistemas de inmersión temporal, es sin duda, la regulación en la obtención de nutrientes por parte de la planta, regulación de las relaciones hídricas, además, definir su tiempo exacto evita principalmente anomalías como la hiperhidratación (Berthouly y Etienne, 2005; Escalona *et al.*, 1999).

El efecto que tiene el aplicar diferentes tiempos de inmersión se puede evidenciar en trabajos como el de Salazar y Hoyos (2007) en la propagación *in vitro* de ñame (*Dioscorea alata*), al evaluar dos tiempos de inmersión de 5 y 10 minutos obtuvo en promedio un coeficiente de multiplicación superior con un tiempo de 10 minutos con 10.07 en comparación con 5.97 de promedio con 5 minutos. Otro trabajo es el de Cabrera *et al.* (2009) en la micropropagación de la misma especie de ñame, evaluando tiempos de inmersión de 10, 15, 20 y 25 minutos, se obtuvieron promedios superiores con un tiempo de 15 minutos en parámetros como número y diámetro de los microtubérculos por planta, peso fresco, peso seco.

En el trabajo de Vilchez *et al.* (2007), se observa la importancia de determinar el tiempo exacto de inmersión, como en el presente trabajo, en la propagación *in vitro* de la sábila (*Aloe vera*), al aplicar tres variables de inmersión a 1, 2 y 3 minutos, los mejores resultados se reportan con 1 minuto de inmersión, los autores reportan la obtención de plántulas hiperhidratadas con 2 y 3 minutos de inmersión apenas 1 y 2 minutos más de inmersión.

En la propagación de la orquídea *Phalenopsis* se han usado tiempos de inmersión cortos de 5 minutos (Park *et al.*, 2000) y 1 minuto (Tirado *et al.*, 2005) o tiempos de inmersión largos de 10 minutos (Hempfling y Preil, 2005). En todos ellos no se reporta el desorden fisiológico de la hiperhidratación lo que concuerda con los resultados de este trabajo donde tampoco se manifestó este desorden. Así mismo los trabajos anteriormente mencionados no evaluaron las respuestas morfológicas en diferentes tiempos de inmersión como se realizó en el presente trabajo, en donde se pudo estimar qué tiempo de inmersión fue el que promovió el mejor coeficiente de multiplicación y mejores características morfológicas de las plantas en una especie de que se encuentra en la Norma Oficial Mexicana lo que hace distintivo este trabajo ya que no existen trabajos previos que hayan empleado orquídeas en alguna categoría de riesgo, sino se han enfocado en la propagación de aquellas que tienen ya un valor comercial por ser plantas de ornato.

En la fase *ex vitro*, las mejores respuestas se obtuvieron con el menor tiempo de inmersión aplicado con 2 minutos, probablemente las plántulas que provenían de tiempos más prolongados 4 y 6 minutos, estaban más adecuadas a recibir mayores cantidades de agua, se sabe que el contacto intermitente de las plantas con el medio líquido, crea una relación entre la fotosíntesis (foto-mixotrófica) y la transpiración, cada tratamiento probablemente tenían cierto ritmo (Cabrera *et al.*, 2011), como consecuencia en la fase *ex vitro* debido a factores como la alta transpiración, tuvo un efecto negativo, desbalanceando este ritmo al cual estaban adecuados; otro factor quizás fue no recibir o recibir grandes volúmenes de agua a los que estaban acostumbradas. La aclimatización fue la misma para todos los tratamientos, probablemente se requiere establecer una aclimatización personalizada para cada una de ellas, en función de los tiempos y frecuencias de inmersión provenientes.

Existen una gran cantidad de investigaciones en las cuales se ha aumentado la eficiencia de la micropropagación, empleando los sistemas de inmersión temporal en comparación con los cultivos en medio sólido. Mencionan Berthouly y Etienne, (2005), que cuando se pretenden emplear los sistemas de inmersión temporal, es

importante tomar datos de crecimiento, producción y calidad del material cultivado, y comparar los datos obtenidos con el sistemas de cultivo *in vitro* tradicional (cultivo en medio sólido).

En orquídeas se han obtenidos mayores coeficientes de multiplicación en la micropropagación *in vitro* de *Phalenopsis*, empleando un SIT. Park *et al.* (2000), obtuvieron un coeficiente de multiplicación superior de 18 en la multiplicación de PLB's en comparación con dos biorreactores, el biorreactor aireado por burbujas y el biorreactor de columna con elevación de aire, obteniendo 10.8 y 6.1 respectivamente además la biomasa se vio favorecida en el cultivo con el uso del RITA. Por su parte Hempling y Preil, (2005), obtuvieron un coeficiente de multiplicación 25.0 en un BIT de 5 litros, en comparación con 3.0 en cultivo con medio sólido.

En el presente trabajo se demostró además que la fisiología de las plántulas obtenidas en un SIT, fueron superiores en comparación con las plántulas obtenidas en el cultivo con medio solido, estos resultados concuerdan con el trabajo de Cabrera *et al.* (2011) en la propagación de ñame (*Dioscorea alata* var. Pacala Duclos) los cuales evaluaron, entre otros parámetros, el contenido de la clorofila a, b y total donde obtuvieron promedios superiores con la aplicación de un SIT, con 46.22, 29.77 y 75.99 μg de clorofila por peso fresco en comparación con un sistemas de inmersión constante con 30.33, 21.22 y 51.55 μg de clorofila por peso fresco respectivamente.

La supervivencia *ex vitro* también se vio favorecida en plántulas obtenidas en un SIT, en comparación con las plántulas provenientes en medio sólido. Existen pocos trabajos en los cuales se ha evaluado la supervivencia *ex vitro*. En el trabajo de Tirado *et al.* (2006) cultivando en un SIT *Phalenopsis*, reportan un porcentaje de supervivencia del 80% sin hacer mención del tiempo de experimentación. En el trabajo de Hempling y Preil (2005) se reporta un porcentaje de supervivencia del 94% a los 42 días de estar bajo condiciones de invernadero. Estos autores usaron una frecuencia de inmersión de ocho veces al día con 10 minutos de inmersión para la fase de multiplicación, para la fase de enraizamiento cambiaron la

frecuencia a seis inmersiones por día con 10 minutos de inmersión y utilizaron Acido Indol Acético para la inducción de raíces.

Una comparación del porcentaje de supervivencia *ex vitro*, en plántulas obtenidas en diferentes sistemas se reporta en el trabajo de Alvarenga, (2010), los cuales al cultivar en un SIT la uña de gato (*Uncaria tomentosa*) obtuvieron porcentajes de supervivencia superiores con 62% en comparación con los porcentajes obtenidos de plantas cultivadas en medio sólido con 5%.

Ávila y Salgado-Garciglia, (2006) lograron un porcentaje de supervivencia de 70% a los 90 días con *L. speciosa*. Sarabia-Ochoa *et al.* (2010) reportan una supervivencia del 70% aunque no mencionan el tiempo de experimentación. En el presente trabajo evaluando la misma orquídea, estos porcentajes fueron superados a los 60 días se reportó un 90% de supervivencia. Un porcentaje similar al obtenido en este trabajo lo reportan Barrera *et al.* (2005), con la misma especie, aunque aquí no se menciona el tiempo de experimentación. Porcentajes de aclimatización superiores se reportan en trabajos como Ortega-Loeza *et al.* (2011), con un porcentaje del 97.5% de supervivencia *ex vitro* después de 60 días. Por su parte Aguilar, (2013) reporta una supervivencia *ex vitro* del 91% de las plántulas obtenidas en medio sólido tradicional. Si bien en estos dos últimos ejemplos los porcentajes de supervivencia *ex vitro* son superiores, estas se caracterizan por aplicar tratamientos de pre-aclimatización *in vitro* para la inducción de raíces con tiempos largos y tratamientos que implican gastos, como el empleo de extractos. Una de las características del empleo de los SIT, es generar ahorros mediante la reducción de costos por producción, incrementando la eficiencia productiva considerando un manejo integral de la etapa de enraizamiento y la fase *ex vitro* (Jiménez y De Feria, 1998). En el presente trabajo las plántulas obtenidas en los SIT, se llevaron directamente a la fase *ex vitro*, sin un tratamiento de inducción de raíces. En plántulas de piña (*Ananas comosus*) los porcentajes de supervivencia fueron de 90 a 100%. Se reporta que plántulas de 6 cm de longitud total pudieron ser directamente plantadas en condiciones de invernadero (Escalona *et al.*, 1999).

Las mejores respuestas, tanto morfológicas como fisiológicas obtenidas en plántulas provenientes de el SIT, se deben a las condiciones físicas que se crean en el propio cultivo. Es decir, con el empleo de medios líquidos el potencial hídrico aumenta, la disponibilidad de agua por parte de las plantas es más eficiente, tras cada inmersión se estimula y facilita una forma más eficiente de suministro de nutrientes a lo largo de toda la superficie de la planta, la mayoría del tiempo los explantes se encuentran recubiertos por una película de medio de cultivo, de esta forma se asegura una constante nutrición y se evita la desecación entre una inmersión a otra, la resistencia a la difusión de gases es baja, existe una mínima ruptura del intercambio gaseoso entre los tejidos y la atmosfera interna del frasco de cultivo, dentro del frasco se renueva el ambiente gaseoso por los intervalos regulados por el tiempo, la agitación mediante el flujo de aire estimula a la planta, causando expansión de los tejidos. Con el tiempo y la frecuencia de inmersión empleados, se favoreció un balance armónico de gases como oxígeno y dióxido de carbono, y se menciona que existe una alta concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo, la cual se alcanza sólo un minuto después del burbujeo, además de que la humedad relativa del aire en los frascos está saturada permanentemente, esto debido al carácter hidrofóbico de los filtros. Al emplear medios de cultivo líquido la dispersión de metabolitos tóxicos permite evitar su acumulación en las áreas del tejido (Alvarad y Teisson, 1993; Teisson y Alvarad, 1995; Escalona *et al.*, 1999; Etienne y Berthouly, 2002; Bertuoly y Etienne, 2005; Preil, 2005; González *et al.*, 2011).

VIII. CONCLUSIONES

- ✓ Se adaptó un Sistema de Inmersión Temporal (SIT) eficiente, con insumos de capital nacional, lo que permitió obtener un sistema accesible y de bajo costo.
- ✓ Se obtuvieron plántulas con mejores características morfológicas, fisiológicas y mayores porcentajes de supervivencia con una frecuencia de seis veces al día.

- ✓ Se obtuvieron plántulas con mayores tallas en un tiempo de inmersión de 4 minutos, sin embargo, con un tiempo de 2 minutos se generaron plántulas con mejores características morfológicas, fisiológica y con mayores porcentajes de supervivencia.
- ✓ Con la mejor combinación de frecuencia y tiempo de inmersión (6 veces y 2 minutos) se obtuvo material biológico con mejores características morfológicas y fisiológicas, en menores tiempos en un SIT, en comparación con los cultivados en medio sólido.
- ✓ El porcentaje de sobrevivencia obtenido fue mayor en las plántulas procedentes del SIT debido a sus mejores características morfológicas en comparación con el cultivo *in vitro* en medio sólido. Así mismo no se requirió de una etapa de aclimatación *in vitro* previo a su establecimiento *ex vitro* lo que representa diversas ventajas como una menor manipulación del material, reducción de insumos para llevar a cabo este proceso.
- ✓ Se obtuvo un coeficiente de multiplicación de (3.0) en sólo 60 días de *Laelia speciosa* con el ajuste de la frecuencia de inmersión a seis veces al día y dos minutos de inmersión. Lo que demuestra que es posible generar un mayor número de plántulas con la frecuencia adecuada en tiempos más cortos que en un sistema en medio sólido que requiere de más del doble del tiempo (120 días) para obtener un coeficiente de multiplicación similar.
- ✓ Esta biotecnología demuestra ser una opción viable más eficiente, rápida, práctica, sencilla y económica que al emplear el medio sólido ya que este último requiere de más tiempo para tener una respuesta eficiente así como para llevar a cabo los subcultivos y sobre todo la elaboración del medio que requiere de más tiempo y es de mayor por el costo por el empleo del agar.
- ✓ Este es el primer reporte de la micropropagación de *L. speciosa* en un SIT de bajo costo, realizando diferentes evaluaciones morfológicas y fisiológica para

determinar la mejor frecuencia y tiempo de inmersión que permitirá su posterior escalamiento como una estrategia de conservación *ex vitro*.

IX. LITERATURA CITADA

Abdelnour-Esquivel A. y Escalant J. 1994. *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales*. CATIE, Costa Rica.

Adelberg J. 2004. Congress symposium proceeding: Plant growth and sugar utilization in an agited, thin-film system for micropropagation. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* **40**:245-250.

Aguilar M.A. 2013. Aclimatización de vitroplantas de *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr. (Orchidaceae) procedente de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo, México. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México, Hidalgo 107 pp.

Aitken-Christe J. y Davies H.E. 1988. Development of a semi-automated micropropagation system. *Acta Horticulturae* **230**:81-87.

Alvarad D. y Teisson C. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **32**:55-60.

Alvarenga S. 2010. Establecimiento *in vitro* y cultivo de células de la uña de gato (*Uncaria tomentosa*) D.C. *Tecnología en marcha* **23**:24-33.

Ávila D.I. y Oyama K. 2002. Manejo sustentable de *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *Biodiversitas* **43**:9-12.

Ávila D.I. y Oyama K. 2007. Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **44**:184-193.

Ávila D.I. y Salgado-Garciglia R. 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Biológicas* **8**:138-149.

- Ávila-Díaz I. Oyama K. Gómez-Alonso C. y Salgado-Garciglia R. *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **99**: 335-343.
- Barrera V.D.G. Chávez A.V.M. y Sandoval Z.E. 2005. Propagación *in vitro* vía organogénesis indirecta de *Laelia speciosa* (Orchidaceae) especie en peligro de extinción. En: *Memoria: XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería del 18 a 23 de septiembre*. Mérida, Yucatán.
- Bellone R. 2006. *Orquídeas: Guía del aficionado*. Omega, España.
- Berthouly M. y Etienne H. 2005. Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. En: Hvoslef-Eide A.K. y Preil W. Eds. *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, pp. 59-73, Springer. Netherlands.
- Cabrera M. Gómez R. Rodríguez S. López J. Rayas A. Basail M. Santos A. Medero V. y Rodríguez G. 2008. Multiplicación *in vitro* de segmentos nodales del clon de ñame Blanco de Guinea (*Dioscorea cayenensis* - *D. rotundata*) en sistemas de cultivo semiautomatizado. *Revista Colombiana de Biotecnología* **2**:97-103.
- Cabrera M. Gómez R. Rayas A. De Feria M. López J. Basail M. Medero V. 2009. Protocolo para la formación de microtubérculos de ñame (*Dioscorea alata* L.) en sistema de inmersión temporal. *Revista Colombiana de Biotecnología* **11**:19-30.
- Cabrera M. Gómez R. y Espinosa E. 2011. Effect of liquid media culture systems on yam plant growth (*Dioscorea alata* L. Pacala Duclos). *Biothechnology Agronomic Society Enviromental* **15**:515-521.
- Calva G. y Pérez J. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: Fuente de alimentos para el futuro. *Revista digital universitaria* **6**:1-16.

- Dressler R.L. 1993. *Phylogeny and Classification of the Orchid Family*. Dioscorides Press, Portland.
- Escalona M. Lorenzo J.C. González B. Daquinta M. Fundora Z. Borroto C.G. Espinosa D. Arias E. y Aspiolea M.E. 1998. New system for *in vitro* propagation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr). *Pineapple News* **5**:5-7.
- Escalona M. Lorenzo J.C. González B. Daquinta M. González J.L. Desjardins Y. y Borroto C.G. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports* **18**:743-748.
- Escalona M. Samson G. Borroto C. y Desjardins Y. 2003. Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. *In vitro Cell Development Biology* **39**:651-656.
- Espinosa A. Silva J.J. González O. Fajardo L. y Pérez J. 2007. Multiplicación *in vitro* de Violeta Africana (*Saintpaulia ionnata*). *Revista Electrónica Granma Ciencia* **11**:1-6.
- Etienne H. y Berthouly M. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **69**:215-231.
- Farahani F. y Majd A. 2012. Comparison of liquid culture methods and effect of temporary immersion bioreactor on growth and multiplication of banana (*Musa*, cv. *Dwarf cavendish*). *African Journal of Biotechnology* **11**:8302-8308.
- Flores M.C. 2006. Patrón de distribución espacial y dinámica de *Oncidium cristagalli*, una especie de orquídea epífita de Chiapas. Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F. 49 pp.
- Flores-Escobar G. Legaria-Solano J.P. Gil-Vásquez I. y Colinas-León M.T. 2008. Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. Una orquídea

- amenazada y endémica de México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* **14**:347-353.
- Flores-Palacios A. y Valencia-Díaz S. 2007. Local illegal trade revealslalt unknown diversity and involves a high species richness of wild vascular epiphytes. *Biological Conservation* **136**:372-387.
- George E.F. 2008. Plant Tissue Culture Procedure – Background. En: George E.F. Hall M.A. y Geert-Jan K. Eds. *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*, pp. 1-28, Springer, Netherlands.
- Glowka L. Burhenne-Guilmin F. Synge H. McNeely J.A. y Gündling L. 1996. *Guía del Convenio sobre la Diversidad Biológica*. The Burlington Press, Cambridge.
- González R. Ríos D. Avilés F. y Sánchez-Olate. 2011. Multiplicación *in vitro* de *Eucalyptus globulus* mediante sistema de inmersión temporal. *Bosque* **32**:147-154.
- Hágsater E. Soto M.A. Salazar G.A. Jiménez R. López M.A. y Dressler L. 2005. *Las Orquídeas de México*. Instituto Chinoín, México, D.F.
- Halbinger F. y Soto M.A. 1997. *Laelias of Mexico*. Orquídea México AMO, México, D.F.
- Harris R.E. y Mason E.B. 1983. Two machines for *in vitro* propagation of plants in liquid media. *Canadian Journal of Plant Science* **63**:311-316.
- Hempling T. y Preil W. 2005. Application of a temporary immersion system in mass propagation of *Phalaenopsis*. En: Hvoslef-Eide A.K. y Preil W. Eds. *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, pp. 231-242, Springer. Netherlands.
- Jiménez E.A. 1998. Generalidades del cultivo *in vitro*. En: Pérez J.N. Ed. *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*, pp. 13-24, Instituto de Biotecnología de plantas, Cuba.

- Jiménez E.A. y De Feria M.A. 1998. Empleo de Biorreactores para la propagación Masiva. En: Pérez J.N. Ed. *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*, pp. 207-224, Instituto de Biotecnología de las plantas, Cuba.
- Jones F. y Flores D. 2007. Establecimiento *in vitro* y pruebas preliminares de micropropagación en medio sólido y líquido de frambuesa (*Rubus idaeus* L.). *Tecnología en marcha* **20**:46-54.
- Kitto S.L. 1997. Commercial micropropagation. *Horticulture Science* **32**:1012-1014.
- Krikorian A.D. 1991. Propagación clonal *in vitro*. En: Roca W.M. y Mroginski L.A. Eds. *Cultivo de tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*, pp. 95-125, CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), Colombia.
- Larson R.A. 1988. *Introducción a la floricultura*. A.G.T., México.
- Lascuráin M. List R. Barraza L. Díaz E. Gual F. Maunder M. Dorantes J. y Luna V.E. 2009. Conservación de especies *ex situ*. En: Dirzo R. González R. y March I.J. Eds. *Capital natural de México, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio*, pp. 517-544, CONABIO, México.
- Lecoufle M. 2006. *Orquídeas. Descripción, cuidados y cultivo*. Omega, España.
- Lezama F.A. 2004. Germinación *in vitro* de semillas de *Laelia speciosa*, orquídea en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, D.F. 12 pp.
- Lezcano Y. Escalona M. y Daquinta M. 2010. Multiplicación *in vitro* de *Paeonias* sp. Variedad 'SeSu' en Sistemas de Inmersión Temporal. *Biotecnología Vegetal* **3**:169-175.
- Lorenzo J.C. González B.L. Escalona M. Teisson C. Espinosa P. y Borroto C. 1998. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **54**:197-200.

- Matsumoto K. y Brandão C. 2002. Comparación de los sistemas de inmersión temporales y permanentes para el cultivo *in vitro* de los bananos. *Infomusa* **11**:36-37.
- Mehrotra S. Kumar M.G. Kukreja A.K. Mishra B.N. 2007. Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. *African Journal of Biotechnology* **6**: 1484-1492.
- Menchaca R.A. y Moreno D. 2011. *Conservación de orquídeas, una tarea de todos*. Universidad Autónoma de Chapingo, México.
- Merino M.E. 1991. Medios de cultivo. Historia del cultivo de tejidos vegetales. En: Hurtado D.V. y Merino M.E. Eds. *Cultivo de Tejidos Vegetales*, pp. 67-85, Trillas, México.
- Mroginski L.A. y Roca W.M. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. En: Roca W.M. y Mroginski L.A. Eds. *Cultivo de tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*, pp. 19-40, CIAT, Colombia.
- Murashige T. y Skoog F.S. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiology*. **5**:173-197.
- Navarro S. y Vera R. 1991. Historia del cultivo de tejidos vegetales. En: Hurtado D.V. y Merino M.E. Eds. *Cultivo de Tejidos Vegetales*, pp. 15-34, Trillas, México.
- Orellana P.A. 1998 a. Introducción a la propagación masiva. En: Pérez J.N. Ed. *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*, pp. 125-133, Instituto de Biotecnología de las plantas, Cuba.
- Orellana P.A. 1998 b. Propagación vía organogénesis. En: Pérez J.N. Ed. *Propagación y Mejora Genética de plantas por Biotecnología*, pp. 151-178, Instituto de Biotecnología de las plantas, Cuba.

- Ortega-Loeza M.M. Salgado-Garciglia R. Gómez-Alonso C. y Ávila-Díaz I. 2011. Acclimatization of the endangered Mexican epiphytic orchid, *Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr. *European Journal of Environmental Sciences* **1**:48-54.
- Paek K.Y. Hahn E.J. y Son S.H. 2001. Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. *In vitro cellular Development Biology-Plant* **37**:149-157.
- Paek K.Y. Chakrabarty D. Hahn E.J. 2005. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **81**:287-300.
- Park S.Y. Murthy H.N. y Paek K.Y. 2000. Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. *Plant Cellular Tissue and Organ Culture* **63**:67-72.
- Peña A. Durand L. y Álvarez, C. 1998. Conservación. En: CONABIO Eds. *La diversidad biológica de México: Estudio de País*, pp. 183-210, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- Pezoa A. 2001. Conservación de la diversidad biológica. En: Squeo F.A. Arancio G. y Gutiérrez J.R. Eds. *Libro rojo de la flora nativa y de los sitios prioritarios para su conservación: Región de Coquimbo*, pp. 270-280, Universidad de la Serena, Chile.
- Pierik R.L.M. 1990. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Mundi-prensa, España.
- Posada L. Gómez R. Reyes M. y Álvares L. 2003. Empleo de los Sistemas de Inmersión Temporal (RITA) en la propagación de plantas vía organogénesis en caña de azúcar y bananos. *Bioteología vegetal* **3**:3-8.
- Preil W. 2005. General introduction: a personal reflection on the use liquid media for *in vitro* culture. En: Hvoslef-Eide A.K. y Preil W. Eds. *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, pp. 1-18, Springer. Netherlands.

- Ramírez J. 1996. Orquídeas de México. CONABIO. *Biodiversitas* **5**:1-5.
- Rivero R. Quiala E. Agramante E. Barbón E. Camacho R. Morejón W. y Pérez M. 2004. Empleo de sistemas de inmersión temporal para la multiplicación *in vitro* de brotes de *Anthurium andraeanum* Lind. var. Lambada. *Bioteología Vegetal* **4**:97-100.
- Roels S. Escalona M. Cejas C. Noceda R. Rodríguez M.J. Canal J. Sandoval y Debergh P. 2005. Optimization of plantain (Musa AAB) micropropagation by temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **82**:57-66.
- Salazar R. y Hoyos R.A. 2007. Multiplicación y tuberización *in vitro* de ñame (*Dioscorea alata* L.) en sistema de inmersión temporal. *Revista de la facultad nacional de agronomía Medellín* **60**:3907-3921.
- Sánchez J. Daquinta M. y Capote I. 2010. Multiplicación *in vitro* de brotes de tres variedades de callas (*Zantedeschia* sp.) empleando sistema de inmersión temporal. *Ciencia y Tecnología* **3**:1-5.
- Santos A. Cabrera M. Gómez R. López J. Rayas A. Basail M. Medero V. y Beovides Y. 2011. Multiplicación en sistema de inmersión temporal del clon de malanga "Viequera" (*Xanthosoma* spp.). *Revista Colombiana de Bioteología* **8**:97-106.
- Sarabia-Ochoa M.E. Ávila-Díaz I. Carlos-Gómez A. y Salgado-Garciclia. 2010. Callus growth and plant regeneration in *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *Lankesteriana* **10**:13-18.
- SEMARNAT-Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-2010, Protección Ambiental-Especies nativas de México de Flora y Fauna Silvestres-Categorías de riesgo y especificación para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. 6 de marzo. México, D.F.

- Sharma N.K. 1992. Automation in plant tissue culture: problems and prospects. *Current Science* **65**:1-5.
- Simonton W. Robacker C. y Krueger S. 1991. A programmable micropropagation apparatus using cycled medium. *Plant Cellular Tissue and Organ Culture* **27**:211-218.
- Singer R.B. 2009. Morfología floral y polinización de orquídeas: el segundo libro de Charles Darwin. *Acta Biológica Colombiana* **14**:337-350.
- Soto M.A. Hágsater E. Jiménez R. Salazar G.A. Solano R. Flores R. y Contreras I. 2007. *Las orquídeas de México: catálogo digital*. Instituto Chinoín, México, D.F.
- Steinmacher D.A. Guerra M.P. Saare-Surminski K. y Lieberei R. 2011. A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Annals of Botany* **108**:1463-1475.
- Takayama S. y Akita M. 2005. Practical aspects of bioreactor application in mass propagation of plants. En: Hvoslef-Eide A.K. y Preil W. Eds. *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, pp. 61-78, Springer. Netherlands.
- Teisson C. y Alvard, D. 1995. A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: temporary immersion. En: Terzi M. Ed. *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*, pp. 105-110, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Téllez M.A.A. (comp.). 2011. *Diagnostico de la familia Orchidaceae en México*. Universidad Autónoma de Chapingo, México.
- Tirado J.M. Naranjo E.J. y Atehortúa L. 2005. Propagación *in vitro* de *Phalaenopsis* (Orchidaceae) a partir de protocormos, mediante el sistema de inmersión temporal "RITA". *Revista Colombiana de Biotecnología* **7**:25-31.

- Tisserat B y Vandercook C.E. 1985. Development of an automated plant culture system. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* **5**:107-117.
- Urquiza E.G. 2009. Análisis de capacidades nacionales para la conservación *in situ*. En: CONABIO Eds. *México: capacidades para la conservación y el uso sustentable de la biodiversidad*, pp. 51-94, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, México.
- Vasil I.K. 1994. Automation of plant propagation. *Plant Cellular Tissue and Organ Culture* **39**:105-108.
- Vilchez J. Ferrer O. Albany N. 2007. Multiplicación *in vitro* de zabila en sistema de inmersión temporal. *Revista de la Facultad de Agronomía* **1**:78-82
- Vilchez J. Albany N. Martínez L. Molina M. Pirela C. Molina M. Álvarez C y Chirinos J. 2011. Multiplicación en sistemas de inmersión temporal y enraizamiento *ex vitro* de ocumo blanco (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). *Revista Colombiana de Biotecnología* **13**:94-102.
- Villalobos A. y Thorpe T.A. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Roca W.M. y Mroginki L.A. Eds. *Cultivo de tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*, pp. 127-141, CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), Colombia.
- Ziv M. 2005. Simple bioreactors for mass propagation of plants. En: Hvoslef-Eide A.K. y Preil W. Eds. *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, pp. 79-94, Springer. Netherlands.