



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

LICENCIATURA EN INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN
VEGETAL

**Desarrollo y multiplicación *in vitro* de
orquídea *Brassolaeliocattleya***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
INGENIERA EN PRODUCCIÓN VEGETAL

PRESENTA

MIREL SÁNCHEZ SOTELO

DIRECTOR: DR. TERESA DE JESÚS RODRÍGUEZ
ROJAS

COORDIRECTOR: DR. ANTONIO CASTILLO GUTIERREZ

AYALA, MORELOS

FEBRERO 2021



Escuela de Estudios Superiores de
XALOSTOC

ESCUELA DE ESTUDIOS SUPERIORES DE XALOSTOC

Secretaría de Docencia

Servicios Académicos

Ayala, Morelos a 12 de abril del 2021.

DRA. JOSEFINA VERGARA SÁNCHEZ
DIRECTORA DE LA EESX
P R E S E N T E

Por medio del presente, los revisores de la tesis que lleva por título: **Desarrollo y Multiplicación *in vitro* de Orquídea Brassolaeliocattleya**, que ha realizado la pasante de la Licenciatura como **Ingeniero en Producción Vegetal, Mirel Sánchez Sotelo**, otorgamos nuestro voto de aprobación para su impresión por haberse realizado las correcciones consideradas pertinentes de nuestra parte.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dra. Teresa de Jesús Rodríguez Rojas

Dr. Antonio Castillo Gutiérrez

M.C. José Francisco Romero Portillo

Dr. Hermes Rebollosa Hernández

Dra. Yessica Flor Cervantes Adame

Mtra. Jessica Santamaria Miranda

**UA
EM**

Av. Nicolás Bravo S/N, Interior Parque Industrial Cuautla, Ayala, Morelos, C.P. 62715 Tel: (777) 329 7981
Ext. 6500 y 6501 Email: eesxalostoc@uaem.mx; eesx.academicos@uaem.mx

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRONICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

TERESA DE JESUS RODRIGUEZ ROJAS | Fecha:2021-04-12 16:14:59 | Firmante

PZ9s9baE1wCtotsFWSc3eRrP194UdO/mfOOGFqbznLZuHKR7QrmpblwnHsu8Ld/s3y0ThMefr26N1LLNoVsKfDgKpHBjHyUxaPjySBwONE6L2Q6z/QHJGygG+/IjQ7JGn/GxOO
DYatsJIZFsvesa5eITrG+UJ0VWj+v/!MNIk+RG1gT28ZdiCU38Cn+Sjwq5H8ICn8sc/FeL/sni3yvDqKjgcmfUzQb8fq+YS8cHES5c2MRbLJkWqjsiDSrsZIRIPIQJBzZOpKI8X26ZMQIL
VJyCxNkALWCryO3buZ0Thxds9E/3q4lpCqpbk49jwpxAhuvRRBziYG0IQ==

HERMES REBOLLOZA HERNANDEZ | Fecha:2021-04-12 16:16:19 | Firmante

saPN1+RObF+dmXKL/Bc/tSAJY0uCb2sTdV8N3ZuuG491D8YBhwzLqL48SezwD2Ba3/GKq/DmI/gAMhQaQAhkCyDj+AeN5EIE5NzxBm97A9/jZ3pxvLbKzlpFXQ1T/jjaOj5SKIThF
hNWhdAamQh6gVRYQ4SakCQ9IE0nSRGUFxwgs3TvhJwy4gINGVleBVRbMgo40SHOe6jFlnPutDM7pKKHm8asPuGLnecwJA1bClwE9KMPVpbqGHYZHUA0kq3Eq8PyIUOuOoL
QPnThVIGYbtlacXimzGnFKw8UUFNK0182+NHRhKEGylWEIEjmkDQ/+IPbsULfA0Y19/FLFJQw==

YESSICA FLOR CERVANTES ADAME | Fecha:2021-04-13 10:07:58 | Firmante

YC4Nj1nNuBQErPAcH2mQUrkZ0YbMPFnlfgAGXKviDnAKLFs+GSV8Bgi4FVDZyK6qluyeebGhgFvMnOZXwF3FZfc51ZDSB7Xj8OD5V46WlqVCom7I4rk5S8khh0FMkILVX3zz
SdcKD/Py2NAF1STG5Y9thZhiREbYY+XGqLIHgzBauMm2sJWsiAeLJ3OXgJbMc1QAid9WA56VUub0UF7Yh9liqZEhRCmFY/IyC2JDDBT/N+76ci6J1eI2nRN02aORHop7PmCG
FlvgVVEK7vZi0EiWkyw0S5ayBhPeEnBi38zn3XEFT//xnOfyTURJvpe+GBG/nz7A3eleSzaAcQ==

JESSICA SANTAMARIA MIRANDA | Fecha:2021-04-13 13:33:52 | Firmante

PZIPGSqcKduXDeLseawHepQdOlstOj8ijYZMtoozsTPgICrgBYxm9mE323Yq3uiWciqKbcfSku21PwUfYNAPJydlDrCy97jg88D2fx0J4CBoVQCHnq3RXo8APhFTQYd8B6WjzBZHk
sn4pW1jDvrGSHu4r/hqaNoubPjdwF8E4DKS40TgZr0Q2jZ60n4k6PDHDFC1oywMFGPhxpxXGHochdcv+/8M3KK6z5LJgAAUv19uBPhzfOlo2IM5wG3JAmPens2dRwZ0AmWp
6xd4xYgrnQbeMwODJ0XVMFSz1GKIhIH6uvH6Jjn676Fpj7k6QZxdn2lwwJlPKWYlig==

JOSE FRANCISCO ROMERO PORTILLO | Fecha:2021-04-26 14:04:16 | Firmante

qIHhHtKjU6cB/PcoG8ZJB74wVioba3ntoZhsadu2i4WB0JgrS8T4xPmAmM4m+wLQ+NjmkGqbASK1HU2XWEVWJIC75ey9S25NcNPWoNgAnFcOkP+e1qm3444JR640cf8HMm
wflhgwfz3M39BnZGVFAUSSNoX+E6MAdA2yUoutC29f4DP5/ozUlpJgb3McRNB60/7JhYy9za7i8GJOrMOBU4QTyH1xlrz9Dewfy/E+XUxTJCS9zGO1CS45k4NJZETA2w3me
ZxlDnkKew53ROLm8jeu4Ton3ZALcWpzu+CsuDwrr+yw4TCctx9yifEDmHojEbfWlqByHN+FZGPA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



60IRSE

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/9veaggiC8ImZajNKwQ0DtyqBQGMUtpzN>



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Teresa De Jesús Rodríguez directora de la tesis por el apoyo brindado para la realización de este trabajo que sin su esfuerzo, conocimientos y enseñanzas no se hubiera logrado.

A la Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc por haber prestado sus instalaciones y el equipo necesario para la realización del trabajo dentro de ellas.

A mi familia por el apoyo brindado durante mi carrera y por los ánimos de que este trabajo se podría lograr.

A todas esas fuentes de información que sin las investigaciones antes presentadas no tendríamos la suficiente información sobre el tema que en este trabajo se habla.

Gracias a todas las personas que ayudaron directa e indirectamente para la realización de este trabajo de investigación

DEDICATORIA

Esta dedicatoria va dirigida primeramente a Dios, a quien agradezco por darme el permiso de concluir con mis estudios, a mis Padres por darme la oportunidad de concluir mis estudios y por todo el apoyo incondicional brindado durante mi educación, por sacarme adelante día con día, por la orientación que me dieron, a mis hermanos por el apoyo brindado.

A la unidad académica por el apoyo que nos brindó dentro de sus instalaciones durante mi formación, a los docentes que ahí laboran por compartir sus conocimientos con nosotros los estudiantes, por orientarnos en salir adelante y construir un mejor futuro.

Resumen

La palabra "orquídea" pertenece al latín *orchis*, con el tiempo derivó en *orchidaceae*, termino con el que se designó a la familia más numerosa del reino vegetal con aproximadamente 25,000 a 35,000 especies, se le encuentra en todos los hábitats y en ambientes muy diversos. La propagación *in vitro* es una técnica de importancia para la producción de orquídeas cuya multiplicación en forma natural es limitada por las características inherentes a las semillas; por ello, la micropropagación ha sido de gran utilidad en la industria de la producción de sus especies, híbridos y cultivares. La comercialización legal de las especies silvestres incluidas en la NOM-059-SEMARNAT-2010 se debe llevar a cabo a partir de individuos procedentes de una unidad de manejo ambiental (UMA), cuyo establecimiento se requiere de la autorización de la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, a través de su Dirección General de Vida Silvestre que certificará, en el caso de las orquídeas, su reproducción y con ello evitar la sobreexplotación de los individuos silvestres y el comercio lícito de orquídeas. La presente investigación tiene como objetivo evaluar el efecto de tres concentraciones de 6-benziladenina (BA) en crecimiento y desarrollo de protocormos a plántulas de catleya (*Brassolaeliocattleya*) *in vitro*. El material vegetal consistió en protocormos provenientes de la germinación *in vitro* de semillas *Brassolaeliocattleya*. Las semillas se germinaron en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) modificado fue suplementado con 100mg·l⁻¹ mioinositol, 1mg·l⁻¹ tiamina HCl, 1mg·l⁻¹ piridoxina HCl, 1mg·l⁻¹ niacina, 1mg·l⁻¹ ácido nicotínico, 1mg·l⁻¹ glicina, 3% de sacarosa; el pH se ajustó a 5,7 y se agregó 0,6% de agar (Merck) y 1,0g de carbón activado, ya que este último absorben sustancias

inhibidoras indeseables como etileno o pigmentos tóxicos además de que propicia el desarrollo de raíces una vez inducidas y visible el inicio de la formación de protocormos se subcultivaron a un nuevo medio con las mismas características pero adicionando las dosis de BA. El crecimiento y desarrollo *in vitro* de protocormos de *Brassolaeliocattleya* presentó mejor resultado adicionando BA en dosis de 1.5 mg·l⁻¹, en donde se promovió la altura de la planta, longitud de la hoja, número de hoja y largo de raíz, obteniendo plántulas grandes y vigorosas para el trasplante y aclimatación. Se requiere realizar estudios posteriores de la interacción de BA y alguna auxina con la finalidad de promover e inducir la raíz ya que en este estudio se observó que no se promovió a tener mayor número de raíces.

INDICE GENERAL

Índice de tablas	1
Índice de figuras	2
1.Introducción	3
1.1 Justificación	5
1.2 Objetivo	7
2. Marco teórico	8
2.1 Importancia de la orquídea	8
2.2 Descripción morfológica	9
2.2.1 Flor	9
2.2.2 Fruto	10
2.2.3 Semillas	10
2.2.4 Hojas	10
2.2.5 Raíz	11
2.3 Propagación	11
2.4 Medio de cultivo in vitro y fitorreguladores	12
3. Materiales y métodos	14
3.1 Material vegetal	15
3.2 Medio de cultivo	17
3.3 Establecimiento de protocormos	17
3.3 Variables evaluadas	18
3.4 Análisis estadístico	20

4. Resultados y discusión	21
5. Conclusiones	27
6. Literatura citada	28

INDICE DE TABLAS

Cuadro 1. Cuadrados medios (CM) y coeficiente de variación (CV) del análisis de varianza de 6 variables evaluadas en 3 tratamientos de benziladenina (BA) en <i>Brassolaeliocattleya</i> .	1
--	---

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación geográfica del donde se estableció el experimento	14
Figura 2. Orquídea <i>Brassolaeliocattleya</i> .	15
Figura 3. Diagrama de establecimiento de experimento	16
Figura 4. Establecimiento de protocormos en la campana de flujo laminar.	17
Figura 5. Evaluación de variables de <i>Brassolaeliocattleya</i>	19
Figura 6. Plántulas de tratamiento 2 adicionado con 1.5 mg·l ⁻¹ de BA.....	22
Figura 7. Plántulas de <i>Brassolaeliocattleya</i> desarrolladas a partir de protocormos en tres diferentes concentraciones de ABA, a) 1.0 mg·l ⁻¹ de BA, b) 1.5 mg·l ⁻¹ de BA y c) 2.0 mg·l ⁻¹ de BA.....	23
Figura 8. Efecto de 3 diferentes dosis de BA adicionadas a un medio de cultivo MS, en <i>Brassolaeliocattleya</i> . ALP: altura de la planta, LH: Largo de la hoja, AH: ancho de la hoja, NH: Número de hojas, NR: Número de raíces y LR: longitud de raíz. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey 0,05).....	25

1.Introducción

La palabra “orquídea” (del latín *orchis*, que a su vez deriva del griego) apareció por vez primera mencionada en un manuscrito del filósofo griego Theophrastus (371-285 a.C.). El nombre significa “*testículo*” y hace alusión a los seudobulbos de algunas especies y al uso medicinal que se le asignaba a esta flor como afrodisíaca y potenciadora de la fertilidad. Con el tiempo, la palabra *orchis* derivó a la familia más numerosa del reino vegetal con aproximadamente 25,000 a 35,000 especies, se le encuentra en todos los hábitats y en ambientes muy diversos (Freuler, 2008). En México se conocen más de 1200 especies de orquídeas (Hágsater *et al.*, 2006).

Las orquídeas tienen un valor comercial importante, *Cattleya* considerada como la reina de las orquídeas es la más conocida, sus híbridos con flores grandes de hasta 15 cm, perfumadas (Fisher, 2007).

Debido a la importancia ornamental y comercial de las orquídeas se han desarrollado diversos métodos de propagación, tanto sexual (a través de semillas) como asexual con el cultivo de segmentos vegetativos (explantes) (Ávila Díaz y Salgado Garciglia, 2006). Una técnica eficaz es el cultivo de tejidos vegetales, considerada una herramienta biotecnológica para la propagación de especies amenazadas, debido a que permite obtener altas tasas de multiplicación a partir de un explante inicial, ya que por semillas o por métodos asexuales, es poco eficiente su reproducción (Pence, 2011).

Diversos estudios se han realizado para cada una de las fases de la propagación *in vitro* pero existe una fase intermedia entre la germinación y la aclimatación, la cual es crecimiento y desarrollo del protocormo el cual proviene de la semilla a obtención de plántula y este requiere de nutrimentos diferentes al de la germinación es por ello que la presente investigación tiene como objetivo evaluar el efecto de tres concentraciones de 6-benziladenina (BA) en crecimiento y desarrollo de protocormos a plántulas de catleya (*Brassolaeliocattleya*) *in vitro*.

La propagación *in vitro* en orquídea es de importancia para establecer protocolos de multiplicación, con la finalidad de obtener y desarrollar los protocormos y crecerlos a plántulas para iniciar la multiplicación masiva y conservación de las especies (Gil *et al.*, 2016)

El medio usado para la germinación *in vitro* es más complejo que las condiciones en como germina en su habitat natural, ya que todos los nutrientes orgánicos e inorgánicos y los azúcares deben estar disponibles para la orquídea en una forma apropiada (McKendrick, 2000).

1.1 Justificación

Actualmente, se presentan cuatro opciones para el cultivo y comercialización de orquídeas epífitas: 1. El saqueo ilegal de plantas de la naturaleza y su venta a bajo precio, 2. La propagación vegetativa, que es muy lenta y poco redituable, 3. La propagación in vitro usando semillas y 4. El cultivo de tejidos (Damon *et al.*, 2004).

La comercialización legal de las especies silvestres incluidas en la NOM-059-SEMARNAT-2010 se debe llevar a cabo a partir de individuos procedentes de una unidad de manejo ambiental (UMA), cuyo establecimiento se requiere de la autorización de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, a través de su Dirección General de Vida Silvestre que certificará, en el caso de las orquídeas, su reproducción y con ello evitar la sobreexplotación de los individuos silvestres y el comercio lícito de orquídeas (Galarza, 2017; Menchaca *et al.*, 2012; Tejeda-Sartorius & Téllez-Velasco, 2017).

La principal problemática de la propagación de las orquídeas es que su sobrevivencia depende de la relación simbiótica que realizan con los hongos micorrízicos mientras que en cultivo asimbiótico pueden llegar a germinar hasta 90% de sus semillas (Sedano *et al.*, 2015).

Existe poca información sobre investigaciones que mencionen resultados sobresalientes en relación a la propagación de las diferentes especies de orquídeas en medio de cultivo; existe información sobre pocas especies nada más,

básicamente de valor comercial. La única opción ha sido aplicar métodos reportados en la literatura para la propagación de especies de orquídeas del mismo género, aun cuando se sabe que las diferencias entre especies puedan ser marcada (Damon *et al.*, 2004).

Por lo anterior es necesario realizar investigaciones enfocadas a determinar las técnicas de propagación que permitan la conservación y una explotación sustentable, que a la vez proporcione beneficios a las comunidades de las regiones de origen (Sedano *et al.*, 2015).

1.2 Objetivo

Diversos estudios se han realizado para cada una de las fases de la propagación *in vitro* pero existe una fase intermedia entre la germinación y la aclimatación, la cual es crecimiento y desarrollo del protocormo el cual proviene de la semilla a obtención de plántula y este requiere de nutrimentos diferentes al de la germinación por consiguiente, la presente investigación tiene como objetivo evaluar el efecto de tres concentraciones de 6-benziladenina (BA) en crecimiento y desarrollo de protocormos a plántulas de catleya (*Brassolaeliocattleya*) *in vitro*.

2. Marco teórico

2.1 Importancia de la orquídea

Una de las características más interesantes de esta familia es su alta proporción de especies endémicas. Se han registrado 444 especies o subespecies que corresponden aproximadamente al 40% del total de taxa en el país (Espejo *et al.*, 2002). En México, la familia Orchidaceae ocupa el tercer lugar a nivel familia con alrededor de 1,260 especies y 170 géneros, de los cuales el 60 % son epifitas (Soto *et al.* 2007).

En México, se dedican 16,268 hectáreas al cultivo de ornamentales con un valor de la producción de 50 millones de dólares, y el 90% de ésta, se concentra en cinco estados de la República Mexicana (Cárdenas, 2009). Las orquídeas son sin duda las flores elite de las ornamentales por su belleza y precio, además, continuamente se producen nuevas variedades con características mejoradas para el comercio como flor de corte o maceta, lo cual representa oportunidades para la exportación (Griesbach, 2002; Winkelmann *et al.*, 2006).

Son consideradas cosmopolitas ya que pueden existir en ambientes cálidos y fríos dependiendo de los microambientes en donde se desarrollen o cultiven. Las regiones tropicales y los bosques de niebla son los ecosistemas favorables para su desarrollo, pero es en las regiones de América tropical en donde existe un mayor número de especies, con excepción de las zonas muy áridas (Hágsater *et al.* 2005).

Su diversidad se ve ampliada dado que, por ser un grupo muy joven en la evolución de las plantas, presenta gran facilidad para dar híbridos exitosos no solamente entre especies del mismo género, sino también intergenéricos (se estima que hay aproximadamente 30,000 híbridos registrados). En el caso de los híbridos, donde se cruzan individuos de un mismo género o de géneros afines (como se da en las orquídeas), las descendencias tendrán características particulares intermedias entre los individuos cruzados (Freuler, 2008).

2.2 Descripción morfológica

Las orquídeas forman parte de las monocotiledóneas (uno de los grandes grupos de las plantas con flor) y constituyen una de las familias más numerosas: fueron descubiertas aproximadamente 25,000 especies, pero aún hay regiones sin relevar fitogeográficamente, varias de ellas en el continente americano (Freuler, 2008). La familia Orchidaceae tiene una amplia diversidad en el reino Plantae con un estimado de 750 géneros y entre 25.000 y 30.000 especies en todo el mundo (Thorpe y Yeung, 2011).

2.2.1 Flor.

Las plantas poseen flores grandes y vistosas que le proporcionan un gran valor ornamental y económico (Calderón, 2007).

Las flores pueden nacer solitarias es decir unifloras o en grupos (inflorescencias), que pueden ser de diferentes tipos como racimos, fascículos o panículas. Los racimos son inflorescencias que no se dividen (simples) y que tienen un eje central visible al que se insertan las flores, a través de tallos delgados o pedicelos. Los

fascículos son inflorescencias que no se dividen y que carecen de un eje central y las flores salen de la axila de la hoja. Por último, las panículas son inflorescencias compuestas de racimos (Giraldo *et al.*, 2011).

2.2.2 Fruto.

El fruto de las orquídeas se caracteriza porque se abre en tres o seis ranuras, tiene forma de una cápsula loculicida, también puede darse el caso raro en el que el fruto tiene forma de baya (Michael, 2005).

2.2.3 Semillas.

Las semillas de orquídeas son muy pequeñas, extremadamente ligeras y se producen en grandes cantidades, su propagación se realiza en forma agámica y por semillas, pero solo unas pocas semillas germinan y perpetúan la especie (Arditti & Abdul, 2000; Lallana *et al.*, 2016). Además de los factores externos mencionados, las orquídeas presentan factores intrínsecos que limitan su propagación sexual y la variación genética que en ellas se puede presentar (Pérez-Martínez & Castañeda-Garzón, 2016).

2.2.4 Hojas.

Las hojas nacen de los tallos y estas pueden ser simples y de margen entero; muchas pueden presentar pecíolo o ser sésiles, de tener esa característica no poseen estípulas; es importante indicar que cuando existen especies adaptadas a la sequía, éstas tienen hojas carnosas que cumplen la función de reserva de agua en épocas de escasez (Michael, 2005).

2.2.5 Raíz.

Las raíces se presentan de acuerdo a la clase de orquídeas; en el tipo de orquídeas terrestres suelen presentarse raíces tuberosas; mientras que en orquídeas epífitas, sus raíces son aéreas y están muy desarrolladas caracterizadas porque cuelgan de los árboles, su color es verde y gruesas debido a sus características tienen doble función, la primera es que sirve como fijación y la otra es para captar nutrientes; así mismo poseen una epidermis esponjosa la misma que se construye por numerosas capas de células muertas (Michael, 2005).

2.3 Propagación

Por otro lado, las orquídeas presentan problemas serios para su propagación en forma natural debido a que la mayor parte de las semillas están escasamente diferenciadas por lo que no se les distinguen los cotiledones ni las radículas y carecen de endospermo (Pierik, 1990). Tradicionalmente, las orquídeas se han propagado asexualmente mediante división de plantas. Sin embargo, se ha demostrado que es posible obtener un gran número de plantas a partir de la germinación de semillas utilizando métodos de cultivo *in vitro* (Arditti, 1993). Algunos trabajos científicos indican que, en condiciones naturales, menos de 5 por ciento del total de las semillas de una cápsula de orquídea pueden germinar (Hágsater *et al.*, 2015).

La propagación *in vitro* es una técnica de importancia para la producción de orquídeas cuya multiplicación en forma natural es limitada por las características inherentes a las semillas; por lo que, la micropropagación ha sido de gran utilidad

en la industria de la producción de sus especies, híbridos y cultivares. La siembra asimbiótica de orquídea constituye una técnica relevante desde el punto de vista comercial y ecológico (Martini *et al.*, 2001).

Las técnicas de micropropagación permiten producir un gran número de plantas, seleccionando los medios de cultivos y los nutrimentos adicionados los cuales sustituyen la función del micobionte en su habitat natural (Menchaca *et al.*, 2012). Con estos métodos se obtiene un porcentaje de germinación del 80 al 100%; y se aumenta el porcentaje de sobrevivencia ya que aproximadamente 0.4 plántulas por cada planta madre alcanzan la etapa reproductiva, aumentando el porcentaje de plántulas se pueden multiplicar y comercializar ejemplares con características sobresalientes que tienen más aceptación comercial, en comparación con los ejemplares silvestres, con lo que se protege a las poblaciones naturales y el aprovechamiento de orquídeas se realiza de manera sustentable (Batty *et al.*, 2001; Menchaca *et al.*, 2012).

Una técnica eficaz es el cultivo de tejidos vegetales, considerada una herramienta biotecnológica para la propagación de especies amenazadas, debido a que permite obtener altas tasas de multiplicación a partir de un explante inicial, ya que por semillas o por métodos asexuales, es poco eficiente su reproducción (Pence, 2011).

2.4 Medio de cultivo *in vitro* y fitorreguladores

El medio de cultivo MS (1962), se ha probado para la germinación y crecimiento de muchas especies, obteniéndose resultados óptimos debido a su contenido en sales

inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos, el cual le brinda el alto grado de nitrógeno y potasio necesario para su nutrición (Salazar & Cancino, 2012).

Otros autores como Dalzotto (2013) y Rodríguez-Rojas *et al.* (2012) comprobaron que el medio de cultivo idóneo y adecuado para la germinación de semillas de orquídeas es el medio de Murashine y Skoog, suplementando con 3% de sacarosa, con pH ajustado a 5,7 y 0.6 % de agar en ambos casos, y con 100 mg·l⁻¹ mioinositol, 1mg·l⁻¹ tiamina HCl, 1mg·l⁻¹ piridoxina HCl, 1mg·l⁻¹ niacina, 1mg·l⁻¹ ácido nicotínico, 1mg·l⁻¹ glicina y 1,0g de carbón activado respectivamente.

(Chyuam-Yih & Norihan, 2011) estudiaron el efecto de cantidades de citoquininas (BA y kinetina: 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 mg·l⁻¹ cada uno) en la inducción de cuerpos protocolares en un medio MS para la propagación *in vitro* de la orquídea *Paphiopedilum*, observando que la adición de las dosis BA no fueron significativamente diferentes entre los tratamientos, sin embargo, la adición de kinetina fue significativo para el tratamiento de 1.0, mg·l⁻¹.

También Ávila-Díaz *et al.* (2009) evaluaron el efecto de BA en germinación de semillas *in vitro* de la orquídea *Laelia speciosa* especie en peligro de extinción, reportando que la adición de BA incremento la germinación, pero pasados 90 días se subcultivaron sin BA y adicionaron GA3 obteniendo plántulas débiles y sin desarrollo de raíces.

3. Materiales y métodos

La investigación se efectuó en el laboratorio de biotecnología de la Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc (UAEM), estado de Morelos, ubicado a los 18° 44' 39'' N y 98° 54' 34'' O, altura de 1 294 msnm, clima cálido semihúmedo, temperatura promedio de 21-24oC, HR baja y precipitaciones promedio entre 720 y 820 mm (Figura 1).

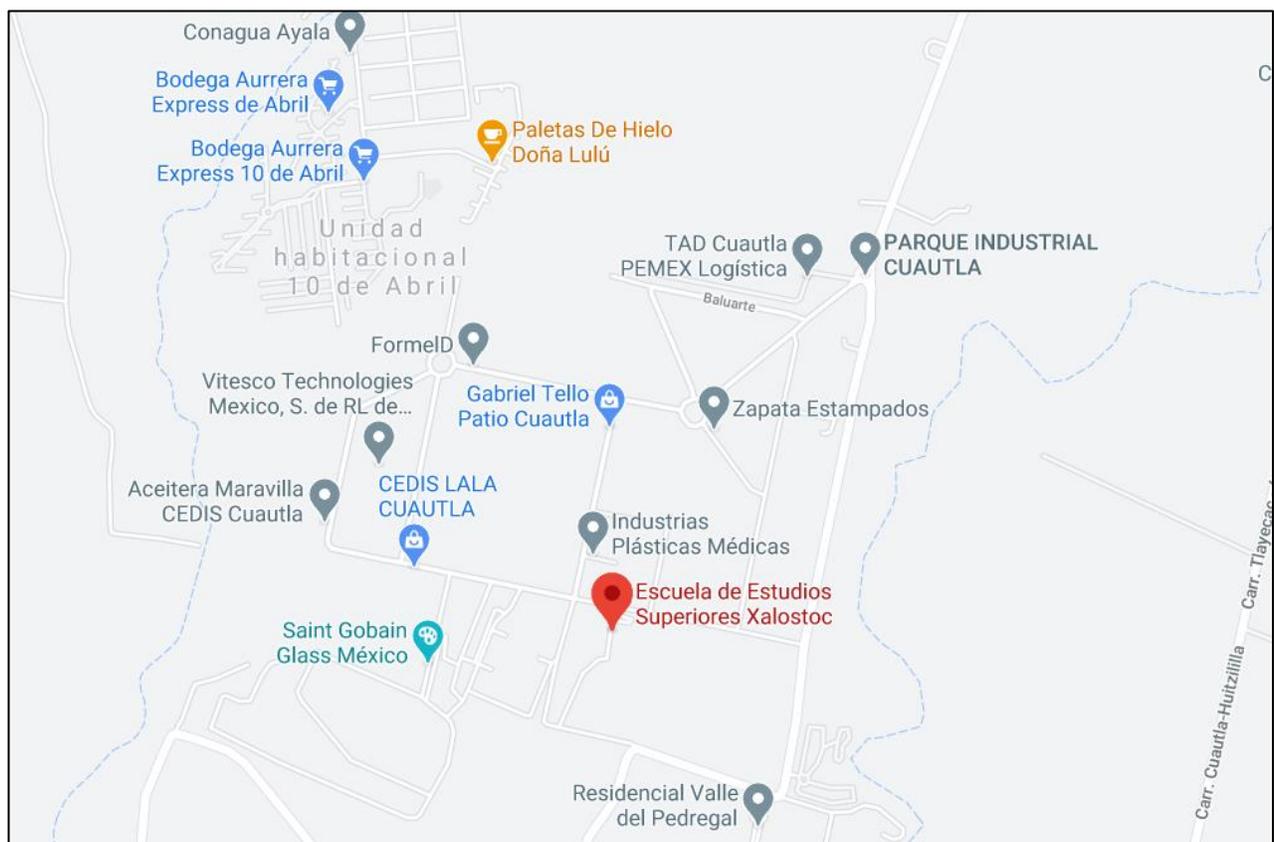


Figura 1. Ubicación geográfica del donde se estableció el experimento

3.1 Material vegetal

El material vegetal consistió en protocormos provenientes de la germinación *in vitro* de semillas *Brassolaeliocattleya* (Figura 2). Las semillas se germinaron en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) modificado por Andrade-Rodríguez *et al.* (2015) fue suplementado con 100mg·l⁻¹ mioinositol, 1mg·l⁻¹ tiamina HCl, 1mg·l⁻¹ piridoxina HCl, 1mg·l⁻¹ niacina, 1mg·l⁻¹ ácido nicotínico, 1mg·l⁻¹ glicina, 3% de sacarosa; el pH se ajustó a 5,7 y se agregó 0,6% de agar (Merck) y 1,0g de carbón activado, ya que este último absorben sustancias inhibitoras indeseables como etileno o pigmentos tóxicos además de que propicia el desarrollo de raíces (Flores-Escobar *et al.*, 2011) una vez inducidas y visible el inicio de la formación de protocormos se subcultivaron a un nuevo medio con las mismas características pero adicionando las dosis de BA (Figura 3).



Figura 2. Orquídea *Brassolaeliocattleya*

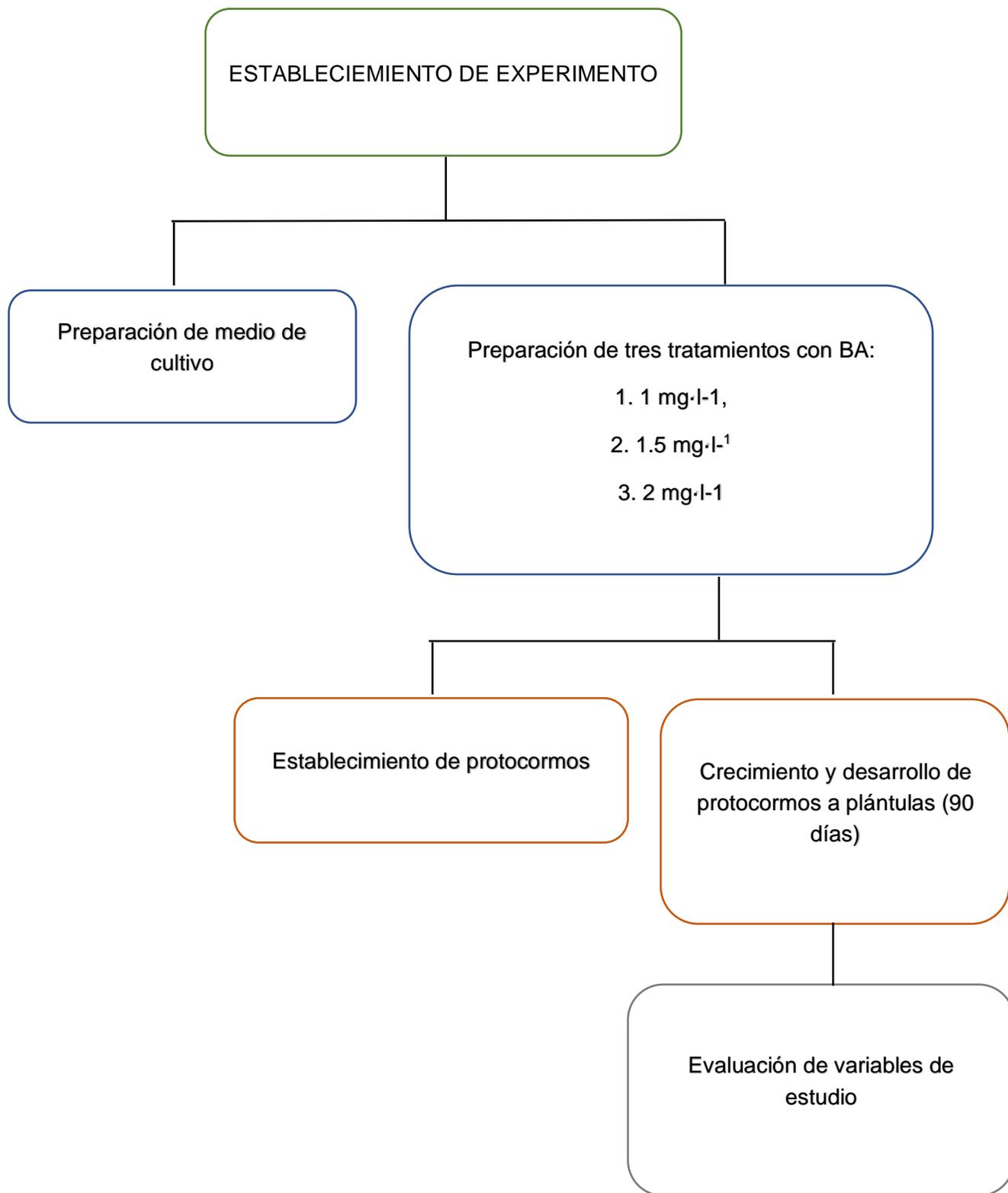


Figura 3. Diagrama de establecimiento de experimento

3.2 Medio de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog modificado por Andrade-Rodríguez *et al.* (2015) adicionando tres tratamientos de BA ($1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $1.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ y $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). El medio se sirvió en frascos de 100ml, colocando 20ml de medio de cultivo y se esterilizó durante 18min a 120°C y $1.5\text{kg}\cdot\text{cm}^{-2}$.

3.3 Establecimiento de protocormos

En una campana de flujo laminar se extrajeron los protocormos de orquídeas, y se colocaron 5 protocormos por frascos con medio de cultivo por cada tratamiento. Los frascos sembrados se colocaron en una cámara climática en incubación a una temperatura de 25°C , fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad, e intensidad luminosa de $29 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Figura 4).



Figura 4. Establecimiento de protocormos en la campana de flujo laminar

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 3 tratamientos y 20 repeticiones, donde la unidad experimental fue cada uno de los frascos con 5 protocormos de Orquídea.

3.3 Variables evaluadas

Una vez establecidos los protocormos se etiquetaron y se colocaron cámara climática en incubación se les dio seguimiento hasta observar el crecimiento del protocormo, el cual fue aproximadamente a los 90 días después del subcultivo de los protocormos, se observó la formación de plántulas y se evaluaron los tratamientos (Figura 5).

Donde las variables a evaluar fueron:

Porcentaje de sobrevivencia: se contaron cuantas plántulas sobrevivieron por frasco y por tratamiento para posteriormente sacar el porcentaje de sobrevivencia.

Altura de la planta: se extrajo de cada frasco las plántulas y se midieron con un vernier (mm) de la base a la punta de la hoja.

Largo de hoja: se extrajo de cada frasco las plántulas y se midieron con un vernier (mm) de la base de la hoja a la parte apical de la hoja.

Ancho de hoja: se extrajo de cada frasco las plántulas y se midieron con un vernier (mm) el ancho de la hoja.

Número de hojas: se extrajo de cada frasco las plántulas y se contó el número de hojas de cada plántula.

Número de raíces: se extrajo de cada frasco las plántulas y se contó el número de raíces de cada plántula.

Longitud de raíces: se extrajo de cada frasco las plántulas y se midieron con un vernier (mm).

Número de brotes generados a partir de los protocormos: se extrajo de cada frasco las plántulas y se contó el número de brotes generados de cada plántula.

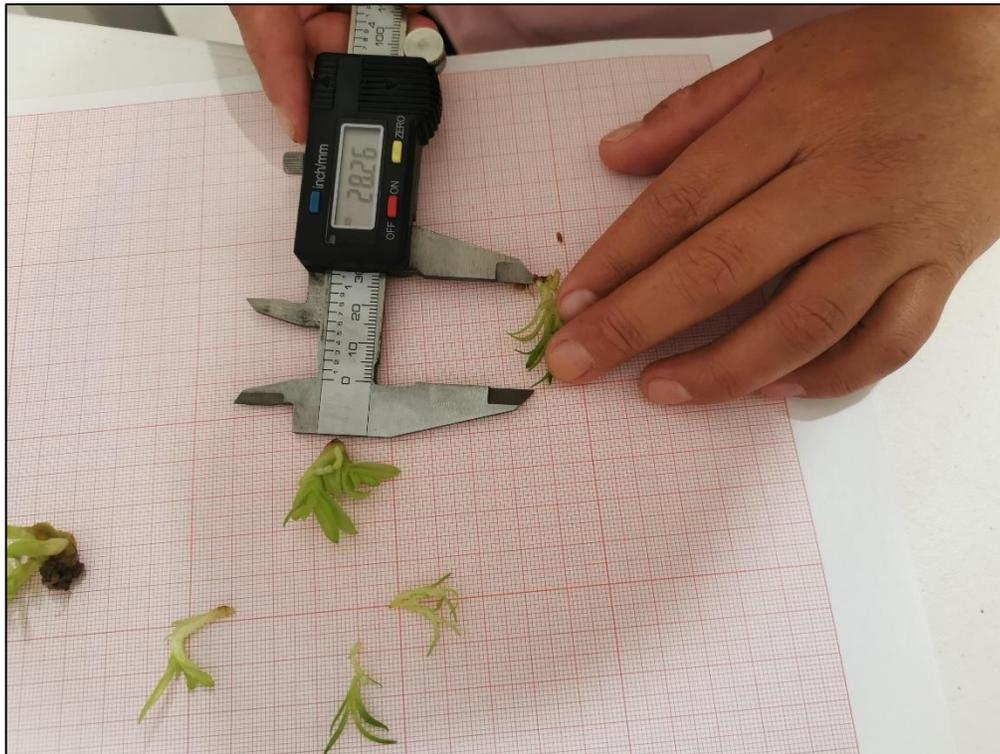


Figura 5. Evaluación de variables de *Brassolaeliocattleya*

3.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos por las variables de respuesta de porcentaje se normalizaron transformándolos mediante la raíz cuadrada más uno y se procesaron mediante análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey, $p \leq 0.05$). El análisis estadístico se realizó con el programa SAS versión 9.0 (SAS Institute, 2002).

4. Resultados y discusión

El tiempo de incubación del establecimiento del protocormo de *Brassolaeliocattleya* hasta el desarrollo, crecimiento y enraizamiento de protocormos fue de 90 días en tres diferentes concentraciones de BA (1 mg·l⁻¹, 1.5 mg·l⁻¹ y 2 mg·l⁻¹). Andrade-Rodríguez *et al.* (2015) observaron que del establecimiento de semilla a el inicio de diferenciación y formación de protocormo fue de 15 días, caracterizado por la formación de pequeños protocormos a partir de los cuales se observó la primera hoja pequeña (meristemo del vástago), la continuación del crecimiento se manifestó con la emisión de nuevas hojas, incremento en altura y grosor de tallo, y en algunos casos la iniciación y crecimiento de rizoides. En cuanto a tiempo de desarrollo y crecimiento del protocormo Ávila-Díaz *et al.* (2009) también reportan 90 días de incubación.

Al respecto también Arditti & Abdul (2000) comenta que el proceso de inducción es lento ya que es baja su capacidad de diferenciación y es lenta su tasa de crecimiento.

El análisis de varianza de los datos obtenidos muestra diferencias altamente significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos esto con respecto a las variables de altura de la planta, número de hojas y longitud de raíz, y siendo significativo para largo de la hoja, y no se observaron diferencias significativas para el ancho de la hoja y número de raíces (Cuadro 1). El medio de cultivo MS adicionado con 1.5 mg·l⁻¹ de BA es el que mostro mayor resultado significativamente (Figura 6). Esto contrasta con lo reportado por Chyuam-Yih & Norihan (2011) quienes estudiaron el efecto de cantidades de citoquininas (BA y kinetina: 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 mg·l⁻¹ cada uno) en la inducción de cuerpos protocormales en un medio MS para la propagación *in vitro* de la orquídea *Paphiopedilum*, observando que la adición de las dosis BA no fueron significativamente diferentes entre los tratamientos.

Cuadro 1. Cuadrados medios (CM) y coeficiente de variación (CV) del análisis de varianza de 6 variables evaluadas en 3 tratamientos de benziladenina (BA) en *Brassolaeliocattleya*.

Variable	CM	CV %
Altura de la planta (mm)	10.13**	23.1
Largo de la hoja (mm)	2.97*	26.7
Ancho de la hoja (mm)	0.17ns	25.8
Número de hojas	2.65**	30.3
Número de raíces	0-029ns	35.2
Longitud de raíz	4.14**	29.14

ns: no significativo $P \geq 0.05$, **: altamente significativo $P \leq 0.05$



Figura 6. Plántulas de tratamiento 2 adicionado con $1.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA.

Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento 2 del medio de cultivo adicionado con $1.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA genero mayor desarrollo, crecimiento y

enraizamiento de los protocormos., los cuales dieron lugar a una plántula. Aunado a ello la adición de $1.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA estimulo la regeneración secundaria de nuevos protocormos, adheridos al mismo sistema radical, el cual se observó con un aumento en el diámetro y longitud. En contraste el menor crecimiento y desarrollo se observó en el tratamiento 3 adicionado con $2.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA en donde no se desarrollaron completamente las raíces (Figura 7).

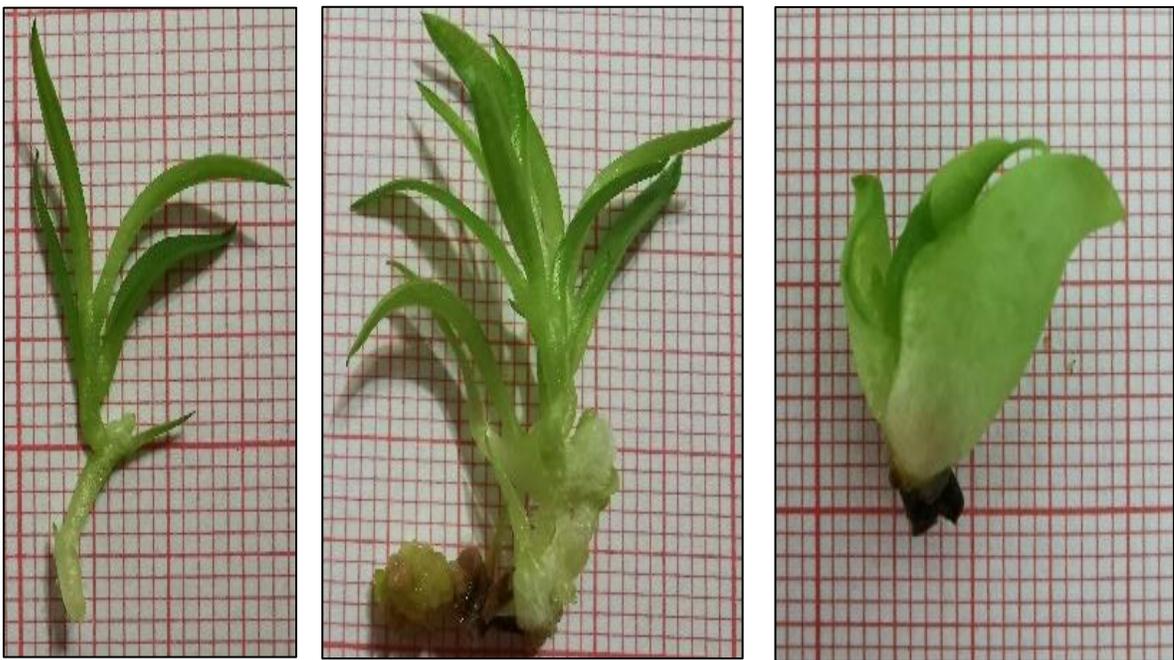


Figura 7. Plántulas de *Brassolaeliocattleya* desarrolladas a partir de protocormos en tres diferentes concentraciones de ABA, a) $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA, b) $1.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA y c) $2.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA.

La regeneración secundaria de protocormos también se presentó en los tratamientos con 1 y 3 pero en porcentajes más bajos, ya que el sistema radical en ambos tratamientos fue muy bajo raíces muy débiles y pequeñas, en algunos casos

ausentes y oxidadas. La adición del BA al medio está relacionada con mayor cantidad de brotes (Peña-Ramírez *et al.*, 2010).

Por otra parte, Chyuam-Yih & Norihan (2011) reporta que la adición de BA inhibe la inducción de la formación secundaria de protocormos, coincidiendo con Ávila-Díaz *et al.* (2009) en donde los medios con BA daban un bajo desarrollo de plántulas secundarias.

Las variables que presentaron una respuesta diferencial en la adición de BA fueron altura de la planta, longitud de la hoja, número de hoja y largo de raíz. Con respecto a la respuesta de la altura de la planta, número de hojas y longitud de raíz, se observó que el medio MS adicionado con $1.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA es el que indujo a mayor respuesta a diferencia del tratamiento 1 y 3 ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ y $2.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA respectivamente) que mostraron menor respuesta a la variable (Figura 8).

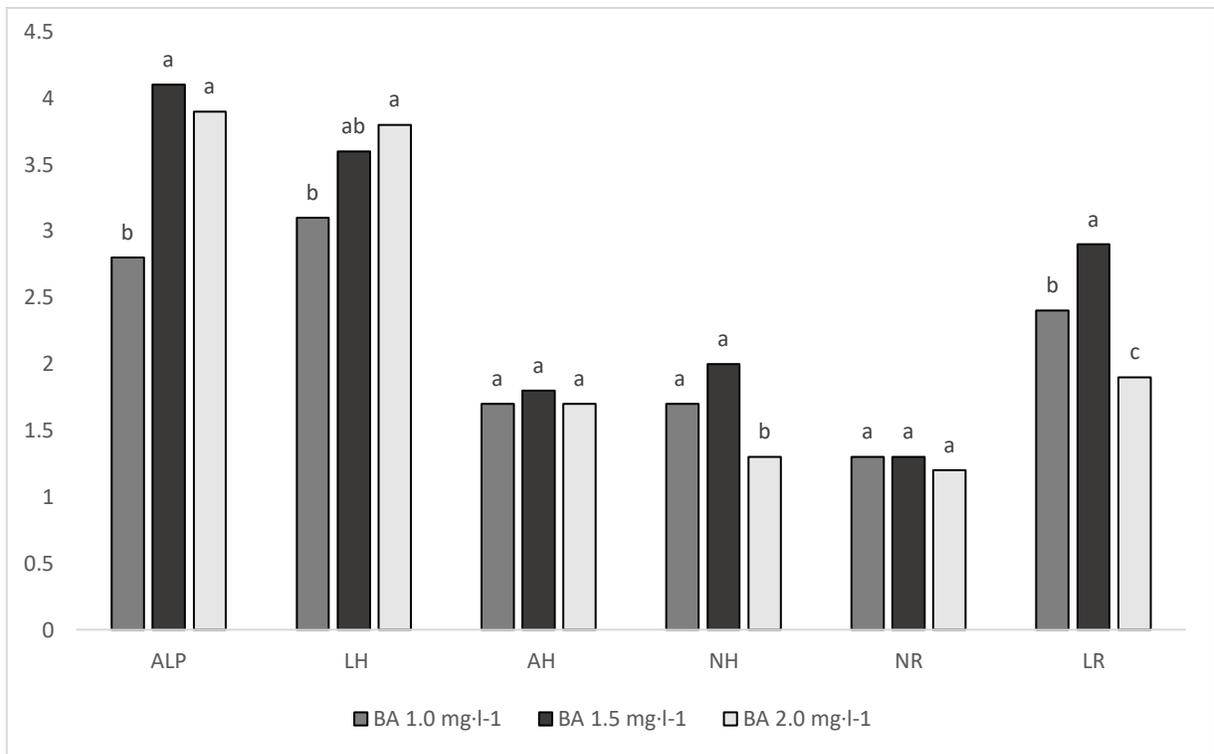


Figura 8. Efecto de 3 diferentes dosis de BA adicionadas a un medio de cultivo MS, en *Brassolaeliocattleya*. ALP: altura de la planta, LH: Largo de la hoja, AH: ancho de la hoja, NH: Número de hojas, NR: Número de raíces y LR: longitud de raíz. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey 0,05).

En cuanto a largo de hoja fue estadísticamente significativo ($P \leq 0.05$), siendo el tratamiento 3 con el que mostro mejor resultado, es decir, al aumentar la dosis de BA al $2.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA se obtuvieron plantas con mayor longitud de hoja. Las variables que no mostraron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$) en cuanto a las diferentes dosis de BA fueron ancho de la hoja y número de raíces fue indistinto el uso de BA adicionado al medio MS. Basker & Narmatha (2010) observaron que al usar BA al $2.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ no se producen raíces.

Los resultados de este estudio indican que la adición de BA al medio MS de $1.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ estimula la formación de nuevos protocormos y que afectan significativamente la altura de la planta, longitud de la hoja, número de hoja y largo de raíz y siendo no significativo para ancho de la hoja y número de raíces. Esto puede atribuirse principalmente a que la planta al absorber las hormonas envía mensajes para acelerar procesos como la elongación del sistema radical, la expansión foliar y la liberación de enzimas hidrolítica, pero una misma hormona puede expresarse de forma pleiotrópica, es decir, una misma hormona participa en diferentes procesos y dependiendo de su concentración puede generar una respuesta estimuladora o inhibitoria, además pueden intervenir en un mismo efecto y su respuesta ocurre en un tiempo determinado (Cruz *et al.*, 2010).

Lo anterior coincide con lo mencionado por Rademacher (2015) quien dice que las interacciones sinérgicas o antagónicas entre diferentes grupos de hormonas se suman a la complejidad del sistema hormonal en plantas ya que puede afectar el desempeño de la planta. Al igual Wegier *et al.* (2013) hace referencia de que reguladores de crecimiento son sustancias que a bajas o altas concentraciones estimulan, inhiben o modifican de alguna manera los procesos fisiológicos. Con lo anterior mencionado se relaciona de el por qué se tiene un efecto negativo en la adición de BA en dosis de $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ y de $2.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ en las *Brassolaeliocattleya*.

5. Conclusiones

El crecimiento y desarrollo *in vitro* de protocormos de *Brassolaeliocattleya* presentó mejor resultado adicionando BA en dosis de $1.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, en donde se promovió la altura de la planta, longitud de la hoja, número de hoja y largo de raíz, obteniendo plántulas grandes y vigorosas para el trasplante y aclimatación.

Se requiere realizar estudios posteriores de la interacción de BA y alguna auxina con la finalidad de promover e inducir la raíz ya que en este estudio se observó que no se promovió a tener mayor número de raíces.

6. Literatura citada

- Andrade-Rodríguez, M., Vargas-Araujo, J., Villegas-Torres, O. G., López-Martínez, V., Guillen-Sánchez, D., & Alia-Tejacal, I. (2015). Germinación de semillas y crecimiento de plántulas de cattleya (*brassolaeliocattleya*) in vitro. *Interciencia*, 40(8), 549–553.
- Arditti, J. (1993) Micropropagation of orchids. Ed. John Wiley and Sons. New York. 949 p.
- Arditti, J., & Abdul, K. A. (2000). Tansley Review No. 110: Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist*, 145(3), 367–421. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00587.x>
- Ávila-Díaz, I., Oyama, K., Gómez-Alonso, C., & Salgado-Garciglia, R. (2009). In vitro propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99(3), 335–343. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9609-8>
- Basker, S., & Narmatha, B. V. (2010). In vitro propagation of an epiphytic and rare orchid *Eria bambusifolia* Lindl. *Research in Biotechnology*, 1, 15–20. <http://researchinbiotechnology.com/index.php/rib/article/view/4>
- Batty, A. L., Dixon, K. W., & Brundrett, M. Sivasithamparam, K. (2001). Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in a Mediterranean bushland. *New Phytologist*, 152, 511–520
- Batty, A. L., Dixon, K. W., Brundrett, M. and Sivasithamparam, K. (2001) Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in a Mediterranean bushland. *New Phytologist*, 152:511-520.

- Calderón, E. (2007) Libro rojo de plantas de Colombia. Orquídeas primera parte, Instituto Alexander von Humboldt- Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, Bogotá, Colombia.
- Cárdenas, A. (2009) Guía verde 2009.5. Prerensa Digital S.A. de C.V. México, D.F. 10: 49-50.
- Chyuam-Yih, N., & Norihan, M. S. (2011). In vitro propagation of Paphiopedilum orchid through formation of protocorm-like bodies. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 105(2), 193–202. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9851-0>
- Cruz, M., Melgarejo, L., & Romero, M. (2010). *Experimentos en fisiología vegetal* (C. impresores Ltda (ed.); Primera ed).
- Dalzotto, C. A. (2013). Efecto de medios de cultivo en el crecimiento in vitro de *Oncidium bifolium* Sims. federal. *Revista Científica Agropecuaria*, 17(1–2), 7–15.
- Damon, A., Aguilar-Guerrero, E., Rivera, L., Nikolaeva, V. (2004) Germinación in vitro de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del soconusco, Chiapas, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 10(2): 195-203.
- Espejo, S. A., García, J. C., López, A. R. F., Jiménez, R. M., Sánchez, L. S. (2002) Orquídeas del Estado de Morelos. Herbario AMO. Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa, México, D. F. México. 332 p.
- Fisher, A. L. (2007) Cultivo de orquídeas. Ed. Grupo imaginador. 1ra ed. Buenos Aires 96 p.
- Fisher, A. L. (2007). *Cultivo de orquídeas* (G. Imaginador (ed.)).

- Flores-Escobar, G., Gil-Vásquez, I., Colinas-León, M. T., & Mata-Rosas, M. (2011). Propagación in vitro de la orquídea *Brassia verrucosa* Bateman ex. Lindl. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 17(1), 5–8.
- Freuler, M. J. (2008) Orquídeas. Ed. Albatros. Buenos Aires, Argentina 112 p.
- Galarza, C. E. P. (2017). *Orquídeas del Perú y herramientas para su identificación* (M. del Ambiente (ed.)).
- Gil, C. A. I., Contreras, P. D. F., & Gutiérrez, R. L. C. (2016). Establecimiento in vitro de protocormos de *Prosthechea* sp. bajo diferentes concentraciones de ácido naftalenacético. *Revista Mutis*, 6(1), 6–15. <https://doi.org/10.21789/22561498.1108>
- Giraldo, G., Betancur, J. (2011) Guía de campo de las orquídeas de Santa María (Boyacá, Colombia), Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Instituto de Ciencias Naturales, 188 p.
- Griesbach, R. J. (2002) Development of *Phalaenopsis* orchids for the mass market. In: Jainick, J., Whipkey A. (Eds.), Trends in New Crops and New Uses. ASHS Press, Alexandria, VA.
- Hágsater, E., Soto, A. M. A., Salazar, C. G. A., Jiménez, M. R., López, R. M. A., & Dressler, R. L. (2006). *Acta Botanica Mexicana* 75: 101-103 (2006). *Las Orquídeas de México*, 75, 101–103.
- Hágsater, E., Soto-Arenas, M. A., Salazar, G.A., Jiménez, R., López, M.A. y Dressler, R. L. (2005) *Las orquídeas de México*. Instituto Chinoin, A.C., México, D.F.
- Lallana, V. H., Billard, C. E., Martínez, V. A., García, L. F., Barsanti, M. V., Di Persia, J. F.,

Dalzotto, C., Scimpft, K. M., & De la Cruz, V. (2016). Conservación de orquídeas nativas de Entre Ríos utilizando técnicas de cultivo de tejidos “in vitro.” *Ciencia, Docencia y Tecnología Suplemento*, 6, 94–121.

Lecoufle, M. (2008). Atlas ilustrado de las orquídeas. Bogotá: Susaeta Ediciones

Martini, P. C., Willadino, L., Dias, A. G., & Tenório, S. D. (2001). Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis*. *Pesq. Agropec. Bras.*, 36(10), 1319–1324.

McKendrick, S. (2000). Manual Para La Germinacion in Vitro De Orquideas. In *Ceiba Foundation for Tropical Conservation* (p. 17).

Menchaca, G. R. A., Lozano, R. M. Á., & Sánchez, M. L. (2012). Strategies for the Sustainable Harvesting of Mexican Orchids. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 3(13), 9–16.

Michael, S. (2005). Ochidaceae plant systematics. en s. michael, ochidaceae plant systematics, 171 -177.

Morales-Hernández, J. L., González-Razo, F. J., Pérez-Chávez, M. A. (2016) Caracterización de las orquídeas epífitas y sus forofitos en el parque ecológico universitario “José Mariano Mociño” de la Universidad Autónoma del Estado de México. *Polibotanica*, 42:103-119.

Pence, V. C (2011) Evaluating costs for the in vitro propagation and preservation of endangered plants. In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47(1): 176-187.

Pence, V. C. (2011) Evaluating costs for the in vitro propagation and preservation of endangered plants. In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47(1): 176-187.

- Pence, V. C. (2011). Evaluating costs for the in vitro propagation and preservation of endangered plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47, 176–187.
- Peña-Ramírez, Y. J., Juárez-Gómez, J., Gómez-López, L., Jerónimo-Pérez, J. L., García-Sheseña, I., González-Rodríguez, J. A., & Manuel, L. R. (2010). Multiple adventitious shoot formation in Spanish Red Cedar (*Cedrela odorata* L.) cultured in vitro using juvenile and mature tissues: An improved micropropagation protocol for a highly valuable tropical tree species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 46(2), 149–160. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9280-0>
- Pérez-Martínez, B. A., & Castañeda-Garzón, S. L. (2016). Propagación in vitro de orquídeas nativas como una contribución para la conservación ex situ. *Biotecnología Vegetal*, 16(3), 143–151.
- Pierik, R. L. (1990) Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 326 p.
- Rademacher, W. (2015). Plant Growth Regulators: Backgrounds and Uses in Plant Production. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(4), 845–872. <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9541-6>
- Rodríguez-Rojas, T. J., Andrade-Rodríguez, M., Alia-Tejacal, I., López-Martínez, V., Espinosa-Zaragoza, S., & Esquinca-Avilés, H. (2012). Caracterización molecular de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq .) Moore & Stearn) Molecular characterization of zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq .) Moore & Stearn). *Revista Facultad de Agronomía (Luz)*, 29, 339–354.

- Salazar, F. J., Benavides, O. L., Trespalacios-González y Pinzón L. F. (2010) Informe sobre el Estado de los Recursos Naturales Renovables y del Ambiente, Componente de Biodiversidad Continental. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos. Alexander von Humboldt. Bogotá, D.C., Colombia 167 p.
- Salazar, M. S. A., & Cancino, O. C. (2012). Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación in vitro de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XIV(1), 53–59.
- Sedano, C. G., Manzo, G. A., Roldán, H. R., Castellanos S. J. A. (2015) Propagación in vitro de orquídeas y otras ornamentales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1:451-456.
- SEMARNAT, (2010) Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo.
- Solórzano, G. B. (2009) La conservación de la vida salvaje. *La ciencia y el Hombre* 22: 4.
- Soto-Arenas, M. A. (2006) La vainilla: restos y perspectivas de su cultivo. *CONABIO. Biodiversitas* 66:1-9.
- Tejeda-Sartorius, O., & Téllez-Velasco, M. A. A. (2017). Riqueza de la familia Orchidaceae en un bosque mesófilo de montaña en Chocamán, Veracruz, México. *Acta Botanica Mexicana*, 121, 139–149. <https://doi.org/10.21829/abm121.2017.1177>
- Wegier, B. A., Barba, E. L., García, C. F., Pérez, S. J., & Flores, G. A. (2013). *Método para*

el establecimiento in vitro de caoba (swietenia macrophylla king) a partir de explantes vegetativos (Issue July).

<http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/3825>

Winkelmann, T., Geier, T., Preil, W. (2006) Commercial in vitro plant production in Germany in 1985–2004. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 86:319–327.