REGENERACIÓN *in vitro* DE PLANTAS DE *Prosthechea vitellina* (LINDLEY) W. E. HIGGING POR ORGANOGENESIS DIRECTA

In vitro REGENERATION OF *Prosthechea vitellina* (LINDLEY) W. E. HIGGINS PLANTS BY DIRECT ORGANOGENESIS

Yazmín Mora-Cruz[1], María Cristina Guadalupe López-Peralta[2]*, Eleodoro Hernández-Meneses[2] y Nicacio Cruz-Huerta[1]

[1]Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Fisiología Vegetal, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. [2]Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. [3]Tecológico Nacional de México, Campus de la Región Sierra, Teapa, Tabasco, México.

**Autora de correspondencia* (cristy@colpos.mx)

RESUMEN

Prosthechea vitellina (Lindley) W. E. Higgins es una orquídea epífita endémica de México con valor ornamental y económico; está sujeta a protección especial por la NOM-059-SEMARNAT-2010 debido al comercio ilegal y la destrucción de su hábitat. El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es una opción para rescate, conservación y propagación masiva de especies amenazadas. El objetivo del presente estudio fue determinar las condiciones óptimas *in vitro* para regenerar plantas por organogénesis directa y aclimatarlas. El proceso se inició con plántulas germinadas *in vitro,* y en las etapas sucesivas se evaluó la concentración de sales del medio Murashige-Skoog (MS, 50 y 100 %), carbón activado, 6-benciladenina (BA, 1.1-2.2 mg L^{-1}), ácido naftalenacético (ANA, 0.19-0.38 mg L^{-1}), ácido indolacético (AIA, 0.18-0.36 mg L^{-1}) y ácido indolbutírico (AIB, 0.5-2.0 mg L^{-1}). En la etapa de aclimatación se evaluaron plantas enraizadas *in vitro* de 5 y 7 cm en diferentes sustratos. Los experimentos se establecieron en un diseño completamente al azar y los datos obtenidos se sometieron a un ANDEVA. En la etapa de inducción la mayor cantidad de brotes (2.03) se obtuvo con 2.2 mg L^{-1} de BA y 0.19 mg L^{-1} de ANA. En la multiplicación se produjeron 2.5 brotes con 1.0 mg L^{-1} de BA y 0.25 mg L^{-1} de AIA a las ocho semanas de cultivo. El alargamiento mayor de brotes (2.16 cm) se logró con MS 50 % y 0.5 g L^{-1} de carbón activado. En el enraizamiento el mayor número de raíces se produjo con 2.0 mg L^{-1} de AIB, generando 5.27 raíces por planta. En la aclimatación, la supervivencia fue de 100 %, con plantas de 7 cm en corteza de pino. El protocolo desarrollado aporta un método para la propagación de esta orquídea con fines de rescate, conservación, reintroducción y aprovechamiento comercial.

Palabras clave: *Prosthechea vitellina*, endémica, micropropagación, morfogénesis, organogénesis, orquídea.

SUMMARY

Prosthechea vitellina (Lindley) W.E. Higgins is an epiphytic orchid endemic to Mexico with ornamental and economic value; it is subject to special protection by NOM-059-SEMARNAT-2010 due to illegal trade and destruction of its habitat. *In vitro* plant tissue culture is an option for rescue, conservation and massive propagation of endangered species. The aim of the present study was to determine optimal *in vitro* conditions to regenerate plants by direct organogenesis and acclimatize them. The process started with germinated seedlings *in vitro*, and in successive stages the concentration of salts of the Murashige-Skoog medium (MS, 50 and 100 %), activated charcoal, 6-benzyl adenine (BA, 1.1-2.2 mg L^{-1}), naphthaleneacetic acid (ANA, 0.19-0.38 mg L^{-1}), indoleacetic acid (IAA, 0.18-0.36 mg L^{-1}) and indole butyric acid (IBA, 0.5-2.0 mg L^{-1}). In the acclimatization stage, 5 and 7-cm *in vitro* rooted plants were evaluated on different substrates. The experiments were established in a completely randomized design and the data obtained were subjected to ANOVA. At the induction stage, the largest number of shoots (2.03) were obtained with 2.2 mg L^{-1} of BA and 0.19 mg L^{-1} of ANA. At multiplication, 2.5 shoots were produced with 1.0 mg L^{-1} of BA and 0.25 mg L^{-1} of IAA at eight weeks of culture. The largest elongation of shoots (2.16 cm) was achieved with MS 50 % and 0.5 g L^{-1} of activated charcoal. At rooting, the largest number of roots occurred with 2.0 mg L^{-1} of IBA, generating 5.27 roots per plant. In acclimatization, survival was 100 %, with 7-cm plants on pine bark. The developed protocol provides a method for the propagation of this orchid for rescue, conservation, reintroduction and commercial use.

Index words: *Prosthechea vitellina*, endemic, micropropagation, morphogenesis, orchid, organogenesis.

INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae comprende más de 900 géneros y es una de las familias más grandes y diversas dentro de las plantas con flores. Las orquídeas habitan en un amplio espectro de condiciones ambientales, se pueden encontrar en todas partes del mundo y en la mayoría de los nichos ecológicos. Las flores son variables en tamaño, forma y color, con estructuras y características fisiológicas especializadas (Goh y Arditti, 2018). Soto *et al*. (2015) reportaron la existencia de 30,000 especies de orquídeas en el mundo, de las cuales México alberga más de 1260, que representan 4.2 % del total de especies. Téllez (2011) mencionó que el porcentaje de endemismo en las orquídeas es del 8 % en géneros y 40 % en especies.

En el estado de Oaxaca habitan aproximadamente 700 especies, distribuidas en 144 géneros y cuatro subespecies (Cox, 2013; Soto y Salazar, 2004). *Prosthechea vitellina* es una especie de orquídea sujeta a protección especial por la NOM-059-SEMARNAT (SEMARNAT, 2010). Un

Recibido: 31 de diciembre de 2021
Aceptado: 10 de octubre de 2022

DOI: https://doi.org/10.35196/rfm.2023.1.33

factor determinante que ha contribuido a la pérdida de la orquideoflora mexicana es el comercio ilegal. Se ha estimado la pérdida de entre 9 y 12 millones de ejemplares en tres años (Téllez, 2011). A pesar de las leyes vigentes que prohíben estas prácticas, las plantas continúan colectándose y exportándose. Es complicado contrarrestar o eliminar la comercialización ilegal porque en muchas ocasiones es una fuente de ingreso para muchas familias y comunidades (Emeterio-Lara *et al*., 2016). *Prosthechea vitellina* no ha escapado de esta problemática generalizada para las orquídeas, por lo que también enfrenta la sobrecolecta de ejemplares silvestres.

La condición de especie amenazada de *P. vitellina* conduce a la búsqueda de estrategias que resuelvan los problemas de reproducción en su ambiente natural, una opción es el uso de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. La propagación *in vitro* de orquídeas amenazadas o sujetas a protección especial representa una forma viable para obtener gran cantidad de plantas con fines de rescate, conservación, reintroducción y aprovechamiento comercial sostenible. La germinación asimbiótica *in vitro* ha sido exitosa en especies de orquídeas silvestres y se ha convertido en una técnica frecuente para la obtención de nuevos híbridos comerciales (Arditti y Ghani, 2000). Con la finalidad contribuir a la conservación y aprovechamiento de esta orquídea, el presente estudio tuvo como objetivo determinar las condiciones óptimas para regenerar *in vitro* plantas de *P. vitellina* por organogénesis directa a partir de plántulas germinadas *in vitro* y su aclimatación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y desinfección

Se utilizaron cápsulas maduras cerradas colectadas de plantas silvestres. La desinfección superficial se basó en el método reportado por Mayo *et al*. (2010). Se lavaron con agua y jabón comercial (Roma®) en agitación continua por 5 min seguido de enjuagues con agua del grifo. En una cabina de flujo laminar se sumergieron en alcohol etílico 70 % en agitación continua por 1 min, se enjuagaron con agua destilada y enseguida se sumergieron en hipoclorito de sodio comercial (NaClO, Cloralex®, 30 % v/v), plata coloidal estable (Microdyn®, 1 % v/v) y Tween® 20 (4 % v/v) por 15 min en agitación continua; después, se sumergieron en Captan® (2 g L^{-1}) por 5 min en agitación.

Medio de cultivo y condiciones de incubación

El medio de cultivo utilizado en las etapas de la organogénesis fue el MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con sacarosa (30 g L^{-1}) y solidificado con agar-agar (Merck®, 7 g L^{-1}). El pH se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl 1N en un potenciómetro (Thermo Scientific® Modelo Orion 3 Star, Waltham, Massachusetts, EUA). La esterilización se hizo en autoclave vertical (AESA® 300, México) a 121 °C y 1.5 kg cm^{-2} de presión por 20 min. Los cultivos se incubaron a 26 ± 2 °C en fotoperiodo de 16 horas e intensidad lumínica de 45 µmol m^{-2} s^{-1}.

Regeneración de plantas por organogénesis directa
Inducción de brotes

Plántulas germinadas *in vitro* de 18 semanas de edad, de 1 a 2 cm de altura y sin raíces se establecieron en medio MS con BA (1.1-2.2 mg L^{-1}) combinado con ANA (0.0, 0.19 y 0.38 mg L^{-1}) y AIA (0.0, 0.18 y 0.36 mg L^{-1}). Se usaron frascos de vidrio de 45 mL de capacidad con 15 mL de medio de cultivo y se hizo un subcultivo a las cuatro semanas. A las ocho semanas se cuantificó el número de brotes por explante (BE) y longitud de los brotes (LB, cm). El experimento tuvo 10 repeticiones por tratamiento, donde la unidad experimental fue un frasco de cultivo con cuatro plántulas.

Crecimiento de brotes

Grupos de brotes de 1 cm se colocaron en medio MS completo y a la mitad de la concentración de sales (MS 50 %), con y sin carbón activado (0.5 g L^{-1}). Se usaron frascos de vidrio de 90 mL de capacidad que contenían 30 mL de medio y a las cuatro semanas se hizo un subcultivo. Después de ocho semanas se cuantificó la longitud de brotes (cm). El experimento tuvo 10 repeticiones por tratamiento y la unidad experimental fue el grupo de brotes por frasco.

Multiplicación de brotes

Brotes de 1.8 cm de longitud se cultivaron en medio MS con BA (1.0, 2.0 y 3.0 mg L^{-1}) combinadas con ANA o AIA (0.25 mg L^{-1}). Se usaron frascos de vidrio de 45 mL de capacidad con 15 mL de medio y se hizo un subcultivo a las cuatro semanas. Después de ocho semanas se evaluó el número de brotes (NB), la longitud de brote (LB, cm) y el porcentaje de brotación (B, %). El experimento tuvo 10 repeticiones por tratamiento y la unidad experimental fueron dos brotes por frasco.

Enraizamiento de plantas

Brotes de 3.5 cm se cultivaron en 50 % de las sales del medio MS con 0.0, 0.5, 1.0 y 2.0 mg L^{-1} de AIB, AIA y ANA. Se usaron frascos de vidrio de 90 mL de capacidad con 30 mL de medio y se hizo un subcultivo a las cuatro semanas. A las cuatro y ocho semanas se cuantificó el porcentaje de enraizamiento y el número de raíces por brote (RB). Cada

tratamiento tuvo 10 repeticiones y la unidad experimental fueron tres brotes por frasco.

Aclimatación de plantas

Plantas enraizadas *in vitro* de 5 y 7 cm se plantaron en corteza de pino y una mezcla de turba + perlita (1:1). Se usaron vasos de poliestireno expandido de 118 mL de capacidad cubiertos con un domo del mismo material. Se fertilizaron con solución 50 % de la concentración de sales del medio MS y a las dos semanas se hicieron tres perforaciones en el domo del vaso para favorecer la aireación. A las cuatro y ocho semanas se cuantificó la supervivencia (%). Los tratamientos tuvieron 20 repeticiones por tratamiento y la unidad experimental fue una planta por vaso.

Análisis estadístico

Los experimentos se establecieron en diseño completamente al azar y los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza (ANDEVA) con el software SAS ver. 9.4 (SAS Institute, 2013) con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) para comparar las medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la desinfección superficial de cápsulas cerradas de *P. vitellina* no se presentaron problemas de contaminación. A partir de la germinación de semillas se obtuvieron plántulas para utilizarlas como explantes en la organogénesis (Figura 1).

Inducción de brotes

En todos los tratamientos se presentó brotación. La mayor cantidad de brotes por explante (2.03) se obtuvo en medio MS completo con 2.2 mg L^{-1} BA y 0.19 mg L^{-1} ANA después de ocho semanas de cultivo; en contraste, el medio MS con 50 % de concentración de sales, 1.1 mg L^{-1} de BA y 0.36 mg L^{-1} de AIA produjo 1.23 brotes. La mayor longitud de los brotes (1.2 cm) se obtuvo con 2.2 mg L^{-1}

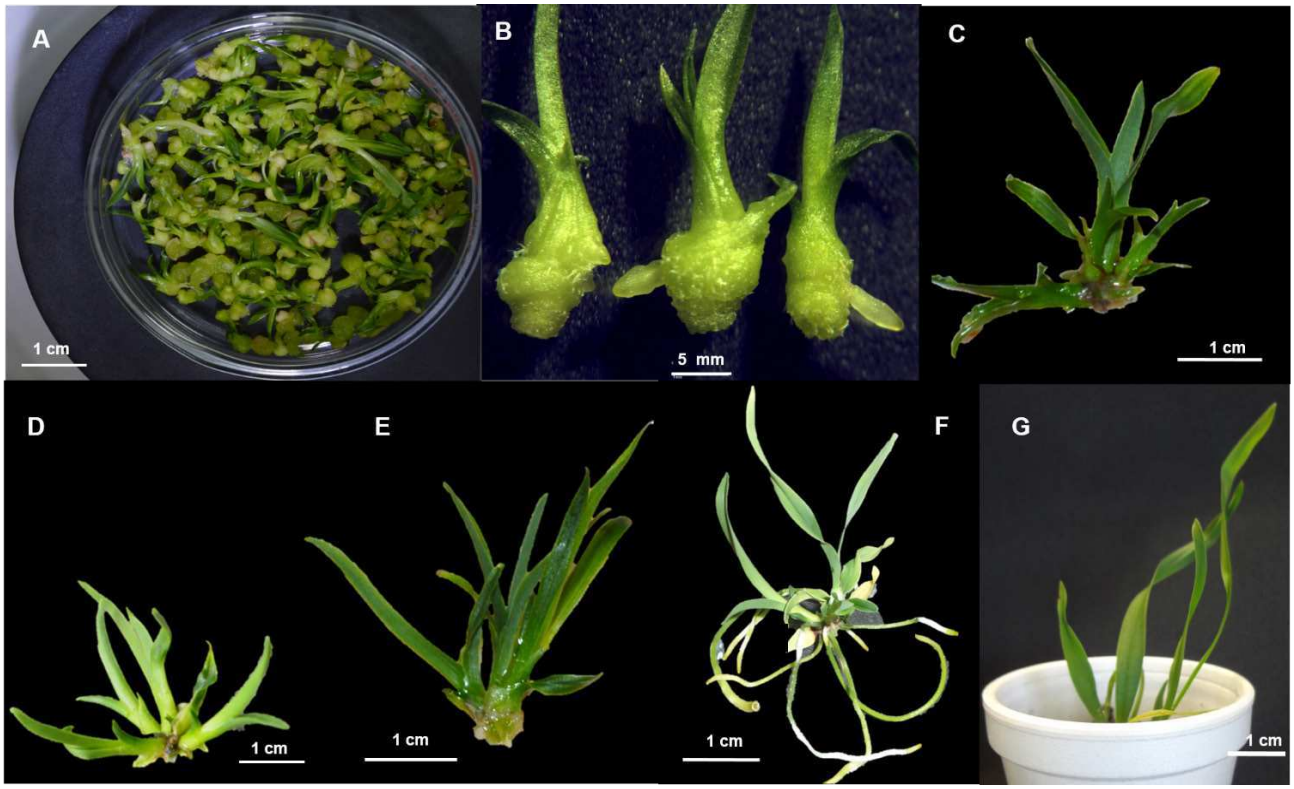


Figura 1. Regeneración *in vitro* de *Prosthechea vitellina* por organogénesis directa. A) germinación después de ocho semanas, B) plántulas *in vitro* utilizadas como explantes para la organogénesis, C) brotes inducidos con 2.2 mg L^{-1} de BA y 0.19 mg L^{-1} de ANA después de ocho semanas, D) multiplicación de brotes con 1.0 mg L^{-1} de BA y 0.25 mg L^{-1} de AIA en medio MS con la mitad de concentración de sales después de ocho semanas, E) alargamiento de brotes en medio MS a la mitad de la concentración de las sales y 0.5 g L^{-1} de carbón activado a las ocho semanas, F) enraizamiento *in vitro* con 2.0 mg L^{-1} de AIB a las 8 semanas, G) aclimatación de plantas después de ocho semanas.

BA + 0.38 mg L^{-1} ANA en una concentración del 100 % del medio MS a las ocho semanas (Figura 1C), a diferencia de la menor longitud (0.86 cm) obtenida con 1.1 mg L^{-1} y 0.38 mg L^{-1} ANA con 50 % de las sales del medio MS (Cuadro 1).

Los brotes se observaron en la base de los explantes, inicialmente de color amarillo claro y después verde. A las cuatro semanas se contaron de uno a dos brotes de 0.5 cm y con las hojas formadas semidesplegadas. A la octava semana los brotes presentaron de dos a tres hojas formadas de color verde intenso y longitud de 1 cm.

En orquídeas, el proceso de organogénesis es inducido por reguladores de crecimiento, principalmente BA y ANA. En *Cattleya trianae* se obtuvo 47.2 % de brotes con 0. 05 mg L^{-1} de BA (Gil *et al*., 2019). En *Phalaenopsis* spp. (Blume) el medio MS con 50 % de concentración de sales adicionado con 4.4 mg L^{-1} de BA y 1.02 mg L^{-1} de ANA favorecieron la inducción de brotes en explantes de yemas florales (Frausto *et al*., 2019).

Crecimientos de brotes

La mejor respuesta en el alargamiento de los brotes (2.16 cm) se obtuvo en medio MS a la mitad de la concentración de las sales y 0.5 g L^{-1} de carbón activado después de ocho semanas (Figura 1E). El mayor número de brotes fue de 3.38 en el medio MS completo y 0.5 g L^{-1} de carbón activado (Cuadro 2).

El carbón activado en la micropropagación de orquídeas mejora el crecimiento y la supervivencia de las plantas *in vitro* debido a que disminuye los compuestos fenólicos, además de que posee una alta afinidad de adsorción a los compuestos inhibidores y sustancias morfogenéticamente activas o tóxicas no identificadas (Kant *et al*., 2016; Park *et al*., 2006).

En *Laelia flava*, *Miltonia flavescens* y *Oncidium trulliferum* 2 g L^{-1} de carbón activado en medio MS a la mitad de la concentración de las sales mejoró la calidad de la planta *in vitro* y favoreció la supervivencia (Moraes *et al*., 2005). En *Cattleya labiata* 1.5 g L^{-1} de carbón activado incrementó el crecimiento de las plántulas *in vitro* después de ocho meses de cultivo (Sipayung *et al*., 2018). En *Pecteilis radiata* la inclusión de carbón activado en el medio de cultivo redujo el oscurecimiento de los protocormos (Kim *et al*., 2019).

Cuadro 1. Número de brotes por explante (BE) y longitud de brotes (LB) inducidos en plántulas *in vitro* de *Prosthechea vitellina* con 6-benciladenina (BA), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolacético (AIA) a las ocho semanas de cultivo.

MS (%)	BA (mg L^{-1})	ANA (mg L^{-1})	AIA (mg L^{-1})	BE	LB (cm)
50	1.1	0.19	-	1.78 abc	0.94 abc
50	1.1	0.38	-	1.58 abc	0.86 c
50	1.1	-	0.18	1.55 abc	0.90 bc
50	1.1	-	0.36	1.23 c	0.89 bc
50	2.2	0.19	-	1.60 abc	1.09 abc
50	2.2	0.38	-	1.58 abc	1.01 abc
50	2.2	-	0.18	1.53 abc	1.01 abc
50	2.2	-	0.36	1.85 ab	0.86 c
100	1.1	0.19	-	1.75 abc	1.12 abc
100	1.1	0.38	-	1.80 abc	1.01 abc
100	1.1	-	0.18	1.60 abc	1.02 abc
100	1.1	-	0.36	1.73 abc	1.07 abc
100	2.2	0.19	-	2.03 a	1.13 abc
100	2.2	0.38	-	1.43 bc	1.20 a
100	2.2	-	0.18	1.30 bc	1.10 abc
100	2.2	-	0.36	1.63 abc	1.16 ab

Medias con letras iguales en las columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

Cuadro 2. Número de brotes (BE) y longitud de brote (BE) en *Prosthechea vitellina* a las ocho semanas de cultivo.

MS (%) + CA (g L^{-1})	Número de brotes	Longitud de brote (cm)
100 + 0.5	3.38 a	2.04 a
50 + 0.5	2.72 b	2.16 a
100 + 0.0	2.22 b	1.55 b
50 + 0.0	2.20 b	1.71 b

Medias con letras iguales en las columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

Multiplicación de brotes

Todos los tratamientos promovieron la brotación en diferentes porcentajes. La mayor cantidad de brotes por explante fue de 2.5 con 1.0 mg L^{-1} de BA y 0.25 mg L^{-1} de AIA en medio MS 50 % después de ocho semanas (Figura 1D). La mayor longitud de brote fue de 1.63 cm con 1.0 mg L^{-1} de BA + 0.25 mg L^{-1} de ANA en medio MS con 50 % de concentración de sales (Cuadro 3). Los brotes se observaron a partir de la segunda semana en la base del explante.

En la organogénesis de orquídeas se han reportado resultados variables. Pant y Thapa (2012) lograron 4.5 brotes por explante en la micropropagación de *Dendrobium primulinum* con 1.5 mg L^{-1} de BA y 0.5 mg L^{-1} de ANA utilizando brotes de 0.3 a 0.5 mm. En *Cymbidium aloifolium*, Kumar *et al*. (2021) obtuvieron un máximo de 39 brotes en medio MS con 1.0 mg L^{-1} de BA. En *Smithsonia maculata*, Decruse y Gangaprasad (2018) obtuvieron 11.25 brotes por explante con 10 mg L^{-1} de BA y 1.0 mg L^{-1} de AIA a las 12 semanas de cultivo. En *Vainilla tahitensis* la dosis de 2 mg L^{-1} de BA promovió 5 y 6 brotes a los 60 y 90 días después de la siembra (Barcia, 2020; Com. Pers,)[1].

En el género *Prosthechea* son limitados los estudios sobre la multiplicación *in vitro*; dentro de la escasa literatura disponible, se ha encontrado que en *P. citrina* 1.5 mg L^{-1} de BA y 0.15 mg L^{-1} de ANA favorecieron la producción de 6.75 brotes por explante (Cazarez *et al*., 2016). La BA en el cultivo *in vitro* promueve la proliferación de orquídeas, debido a que interviene principalmente en la división celular (Raven *et al*., 1992). A medida que se producen más células en un tejido, es mayor el potencial de regeneración (Veltcheva y Svetleva, 2005); este efecto es variable por el estado de diferenciación de las células (Gil *et al*., 2019).

Enraizamiento de plantas

Todos los tratamientos promovieron el enraizamiento, aunque las diferencias significativas sólo se presentaron en el número de raíces a las cuatro semanas. El 90 % se obtuvo en los tratamientos con 1.0 mg L^{-1} de ANA y con 0.5 mg L^{-1} de AIB a las ocho semanas de cultivo, sin encontrar diferencias entre tratamientos para el número de raíces a las ocho semanas (Figura 1F, Cuadro 4).

La presencia de raíces se observó a partir de la segunda semana en todos los tratamientos; al inicio fueron casi transparentes y después verdes. A la octava semana las raíces aumentaron en número y tamaño, tomando la característica forma de las raíces de orquídeas, con coloración verde más oscuro y protegidas por el velamen.

En orquídeas se han usado las auxinas para promover el enraizamiento, solas o combinadas con otras auxinas o citocininas (Mirani *et al*., 2017). Las auxinas estimulan la iniciación y el desarrollo de la raíz lateral activando las células del pericliclo (Fukaki y Tasaka, 2009). El enraizamiento *in vitro* es la etapa más importante del trasplante exitoso de las plántulas. En *Dendrobium nobile* Mirani *et al*. (2017) obtuvieron la mejor respuesta con 3 mg L^{-1} de ANA. En *P. citrina* las raíces alcanzaron la mayor longitud de 3.2 cm con 3 mg L^{-1} de ANA y 0.3 mg L^{-1} de BA (Cazarez *et al*., 2016). En *Vanilla planifolia* el tratamiento de 0.5 mg L^{-1} de AIA promovió el enraizamiento (Carranza-Álvarez *et al*., 2021), mientras que en *Ansellia africana* el porcentaje de enraizamiento más alto se logró con 3.0 mg L^{-1} de AIB y 30 µM de floroglucinol (Bhattacharyya *et al*., 2018).

También se han utilizado auxinas en combinación con compuestos orgánicos, como en el caso de *Stanhopea tigrina*, donde 100 mL L^{-1} de agua de coco, sola o en combinación con AIA, promovieron la producción de raíces (Castillo-Pérez *et al*., 2021).

Aclimatación de plantas

En la cuarta y octava semana se obtuvo 100 % de supervivencia con plantas de 7 cm en corteza de pino (Figura 1G, Cuadro 5). Existen diferentes sustratos para aclimatar plantas de orquídeas (Vera, 2020; Com. Pers.)[2]. La supervivencia de las plantas aclimatadas depende mucho de los sustratos; en *P. citrina* a los 30 días la mejor mezcla fue corteza de encino, tezontle y carbón 1:1:1, donde hubo 85 % de supervivencia (Cazares *et al*., 2016). Domínguez y Hernández (2006) reportaron 100 % de supervivencia en

[1]**Barcia J. B. S (2020)** Evaluación de diferentes dosis de la citocinina BAP en la propagación *in vitro* de *Vainilla tahitensis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Guayaquil. Guayaquil, Ecuador. 59 p.

[2]**Vera T. R. H. M (2020)** Optimización de protocolos para la aclimatación de plántulas de orquídeas provenientes de cultivo *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional de San Martin. Tarapoto, Perú. 67 p.

Cuadro 3. Número de brotes por explante (BE), longitud de brote (LB) y brotación (B, %) en *Prosthechea vitellina* con 6-benciladenina (BA), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolacético (AIA) a las ocho semanas de cultivo.

MS (%)	BA (mg L^{-1})	ANA (mg L^{-1})	AIA (mg L^{-1})	BE	LB (cm)	B (%)
50	1.0	0.25	-	2.25 a	1.63 a	95 a
50	1.0	-	0.25	2.50 a	1.33 ab	100 a
50	2.0	0.25	-	1.75 ab	1.16 ab	95 a
50	2.0	-	0.25	2.00 ab	1.04 b	95 a
50	3.0	0.25	-	1.85 ab	1.31 ab	100 a
50	3.0	-	0.25	1.90 ab	1.19 ab	95 a
100	1.0	0.25	-	2.05 ab	1.11 b	95 a
100	1.0	-	0.25	1.65 ab	1.13 b	95 a
100	2.0	0.25	-	1.60 ab	1.01 b	75 a
100	2.0	-	0.25	1.65 ab	1.14 ab	90 a
100	3.0	0.25	-	1.35 ab	0.84 b	85 a
100	3.0	-	0.25	1.60 ab	0.89 b	85 a

Medias con letras iguales en las columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

Cuadro 4. Enraizamiento *in vitro* de plántulas de *Prosthechea vitellina* con ácido indol-3-butírico (AIB), ácido indolacético (AIA) y ácido naftalenacético (ANA) a las cuatro y ocho semanas de cultivo.

Regulador de crecimiento (mg L^{-1})	4 semanas		8 semanas	
	Número de raíces	Enraizamiento (%)	Número de raíces	Enraizamiento (%)
0 .0	2.37 ab	73.33	3.97 a	83.33
0.5 AIB	2.93 a	83.33	4.47 a	90.00
1.0 AIB	1.57 ab	63.33	4.23 a	80.00
2.0 AIB	1.57 ab	53.33	5.27 a	80.00
0.5 AIA	2.57 ab	73.33	4.30 a	86.67
1.0 AIA	2.27 ab	66.67	4.47 a	76.67
2.0 AIA	1.50 ab	53.33	3.30 a	73.33
0.5 ANA	2.00 ab	60.00	3.53 a	73.33
1.0 ANA	2.53 ab	80.00	4.50 a	90.00
2.0 ANA	1.17 b	63.33	3.97 a	86.67

Medias con letras iguales en las columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

Cuadro 5. Aclimatación de plántulas de *Prosthechea vitellina* con tamaño de 5 y 7 cm en sustrato de corteza de pino (CP) y turba + perlita (T + P) después de cuatro y ocho semanas.

Sustrato + Tamaño de plántula (cm)	Supervivencia 4 sem (%)	Supervivencia 8 sem (%)
CP + 5	90.0 a	90.0 a
CP + 7	100.0 a	100.0 a
T + P + 5	50.0 b	30.0 b
T + P + 7	100.0 a	80.0 a

Medias con letras iguales en las columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey, P ≤ 0.05).

Encyclia phoenicia en una combinación de turba, carbón vegetal y grava (1:1:1).

CONCLUSIONES

Se estableció un protocolo que determinó las condiciones óptimas para regenerar plantas de *Prosthechea vitellina* por organogénesis directa a partir de plántulas germinadas *in vitro*, expuestas a diferentes concentraciones de hormonas vegetales. Este protocolo representa una opción importante para la propagación *in vitro* de la especie, donde, además de la reproducción, puede utilizarse con fines de rescate, conservación, reintroducción y aprovechamiento comercial.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo por las instalaciones proporcionadas y el financiamiento para el desarrollo de la investigación, y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca nacional (618359) otorgada para hacer estudios de posgrado.

BIBLIOGRAFÍA

Arditti J. and A. K. A. Ghani (2000) Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist* 145:367-421, https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00587.x

Bhattacharyya P., V. Kumar and J. Van Staden (2018) *In vitro* encapsulation based short term storage and assessment of genetic homogeneity in regenerated *Ansellia africana* (Leopard orchid) using gene targeted molecular markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 133:299-310, https://doi.org/10.1007/s11240-018-1382-0

Carranza-Álvarez C., K. L. Trinidad-García, H. Reyes-Hernández, L. J. Castillo-Pérez y J. Fortanelli-Martínez (2021) Efecto de extractos orgánicos naturales sobre la micropropagación de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews (Orchidaceae). *Biotecnia* 23:5-12, https://doi.org/10.18633/biotecnia.v23i1.805

Castillo-Pérez L. J., D. Martínez-Soto, J. Fortanelli-Martínez and C. Carranza-Álvarez (2021) Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and symbiotic acclimatization of the Mexican threatened orchid *Stanhopea tigrina*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 146:249-257, https://doi.org/10.1007/s11240-021-02064-9

Cazarez F. T. L., J. J. Graciano L., S. Solís G., B. Díaz R., J. A. Nájera L., J. B. Montoya A. (2016) Propagación *in vitro* de la orquídea *Prosthechea citrina* (La Llave & Lex.) W. E Higgins nativa del estado de Durango, México. *Investigación y Ciencia* 24:19-25.

Cox T. L. D. (2013) Orquídeas: importancia y uso en México. *Bioagrociencias* 6:4-7.

Decruse S. W. and A. Gangaprasad (2018) Restoration of *Smithsonia maculata* (Dalz.) Saldanha, an endemic and vulnerable orchid of Western Ghats through *in vitro* propagation. *Journal of the Orchid Society of India* 32:25-32.

Domínguez R. Y. y G. Hernández V. (2006) Aclimatación de plantas *in vitro* de *Encyclia phoenicia* (Ldl.) Neum. (Orchidaceae) en diferentes sustratos. *Biotecnología Vegetal* 6:225-240.

Emeterio-Lara A., V. Palma-Linares, L. M. Vázquez-García y J. Mejía-Carranza (2016) Usos y comercialización de orquídeas silvestres en la región sur del estado de México. *Polibotánica* 42:197-214, https://doi.org/10.18387/polibotanica.42.10

Frausto J. K. A., M. C. Ojeda Z., O. G. Alvarado G., E. A. García Z., H. Rodríguez F. y G. Rodríguez P. (2019) Inducción de brotes a partir de varas florales de la orquídea *Phalaenopsis* spp. (Blume) *in vitro*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 10:1207-1218, https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.608

Fukaki H. and M. Tasaka (2009) Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Molecular Biology* 69:437-449, https://doi.org/10.1007/s11103-008-9417-2

Gil C. A. I., C. A. Ariza C., L. M. Castillo T., L. E. Salgado D., L. Banda S. y L. E. Vanegas M. (2019) Inducción de organogénesis *in vitro* con 6-bencilaminopurina en *Cattleya trianae* Linden & Rchb.f. *Revista U.D.C.A. Actualidad y Divulgación Científica* 22:e1275, https://doi.org/10.31910/rudca.v22.n2.2019.1275

Goh C. J. and J. Arditti (2018) Orchidaceae. En. Orchids; Fr. Orchidées; Ge. Orchideen; Sp. Orquídeas. *In*: Handbook of Flowering. A. H. Helevy (ed.). CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. pp:309-336.

Kant R., A. Gupta y M. M. Hossain (2016) Micropropagation of orchids through leaf culture. *In*: *In vitro* Culture of Commercial Flowering Plants: Orchids. SERBD Books. Uttar Pradesh, India. pp:31-65.

Kim D. H., K. W. Kang, G. Enkhtaivan, U. Jan y I. Sivanesan (2019) Impact of activated charcoal, culture medium strength and thidiazuron on non-symbiotic *in vitro* seed germination of *Pecteilis radiata* (Thunb.) Raf. *South African Journal of Botany* 124:144-150, https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.04.015

Kumar A., S. Chauhan, S. Rattan, A. R. Warghat, D. Kumar and B. Bhargava (2021) *In vitro* propagation and phyto-chemical assessment of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw: an orchid of pharma-horticultural importance. *South African Journal of Botany* 144:261-269, https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.06.030

Mayo M. A., J. G. Cázares C., E. De la Cruz L. y A. Flores H. (2010) Germinación *in vitro* de Semillas y Desarrollo de Plántulas de Orquídeas Silvestres de Tabasco. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México. 32 p.

Mirani A. A., A. A. Abul-Soad and G. S. Markhand (2017) *In vitro* rooting of *Dendrobium nobile* orchid: multiple responses to auxin combinations. *Notulae Scientia Biologicae* 9:84-88, https//doi.

org/10.15835/nsb919894

Moraes L. M., R. T. Faria and F. L. Cuquel (2005) Activated charcoal for *in vitro* propagation of Brazilian orchids. *Acta Horticulturae* 683:383-390, https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.683.50

Murashige T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497, https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Pant B. and D. Thapa (2012) *In vitro* mass propagation of an epiphytic orchid, *Dendrobium primulinum* Lindl. through shoot tip culture. *African Journal of Biotechnology* 11:9970-9974, https://doi.org/10.5897/AJB11.3106

Park S. Y., K. S. Shin and K. Y Paek (2006) Increased ethylene and decreased phenolic compounds stimulate somatic embryo regeneration in leaf thin section cultures of *Doritaenopsis hybrid*. *Journal of Plant Biology* 49:358-363, https://doi.org/10.1007/BF03178812

Raven P. H., R. F. Evert y S. E. Eichhorn (1992) Biología de las Plantas. Trad. del Inglés por S. Santamaría del Campo. Reverté. Barcelona, España. 402 p.

SAS Institute (2013) The SAS System for Windows. Release 9.4. SAS Institute Inc. Cary, North Carolina, USA.

SEMARNAT, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2010) Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. Ciudad de México. 30 de diciembre de 2010.

Sipayung P., J. Matanari, M. B. Lafau, Y. S. Sulastri, B. B. Ginting, D. R. Sihombing, … and T. Giawa (2018) The effect of activated charcoal dose and benzyl amino purine concentration on the growth of orchid plantlets in Murashige and Skoog media *in vitro*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 205:012025, https://doi.org/10.1088/1755-1315/205/1/012025

Soto A. M. A. y G. A. Salazar (2004) Orquídeas. *In*: Biodiversidad de Oaxaca. A. García-Mendoza, M. J. Ordóñez D. y M. Briones-Salas (eds.). Instituto de Biología UNAM, Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza, Word Wildlife Fund. México, D. F. pp:271-295.

Soto A. M. A., R. Solano G. and E. Hágsater (2015) Risk of extinction and patterns of diversity loss in Mexican orchids. *Lankesteriana* 7:114-121, https://doi.org/10.15517/lank.v7i1-2.18449

Téllez V. M. A. (2011) Análisis del Diagnóstico de la Familia Orchidaceae en México. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 174 p.

Veltcheva M. R. and D. L. Svetleva (2005) *In vitro* regeneration of *Phaseolus vulgaris* via organogenesis from petiole explants. *Journal of Central European Agriculture* 6:53-58.