



**UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**

FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA PRESIDENTE JUÁREZ

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA TEMÁTICA DE FISIOLOGÍA Y GENÉTICA VEGETAL**

**INDUCCIÓN *in vitro* DE POLIPLOIDÍA EN *Laelia
autumnalis* y *Oncidium tigrinum*, DOS ESPECIES NATIVAS
DE MÉXICO**

TESIS

QUE PRESENTA

JUAN MANUEL GÓMEZ SANABRIA

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DIRECTORA DE TESIS
DRA. MARTHA ELENA PEDRAZA SANTOS**

Uruapan, Michoacán. Septiembre 2019





UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

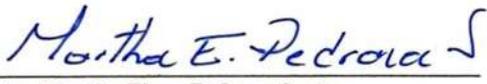
DRA. LILIANA MÁRQUEZ BENAVIDES
COORDINADORA GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Inducción *in vitro* de poliploidía en *Laelia autumnalis* y *Oncidium tigrinum*, dos especies nativas de México" presentado por el ING. JUAN MANUEL GÓMEZ SANABRIA con Número de Matrícula 0102015A, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestro en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
Morelia, Michoacán, a 09 de julio de 2019

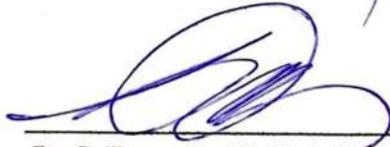
MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA


Dra. Martha Elena Pedraza Santos


Dra. Ana Tetzqui Chávez Bárcenas


Dra. Patricia Delgado Valerio


Dra. María de las Nieves Rodríguez Mendoza


Dr. Guillermo Carrillo Castañeda

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Importancia de las orquídeas	4
2.1.1 <i>Laelia autumnalis</i>	6
2.1.2 <i>Oncidium tigrinum</i>	7
2.2 Mejoramiento genético de orquídeas	8
2.3 Mejoramiento genético mediante poliploidía	10
2.3.1 Soluciones antimitóticas	11
2.3.2 Tejido vegetal	11
2.4 Variedades ornamentales obtenidas por poliploidía	12
2.5 Registro de variedades vegetales	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1 Localización del sitio experimental	18
3.2 Material vegetal	18
3.3 Inducción de poliploidía	21
3.4 Conteo de cromosomas	23
IV. RESULTADOS	25
4.1 Desarrollo de plántulas de <i>Laelia autumnalis</i> a partir de semillas tratadas con soluciones antimitóticas	25
4.2 Desarrollo de plántulas de <i>Laelia autumnalis</i> a partir de protocormos tratados con soluciones antimitóticas	34
4.3 Desarrollo de plántulas de <i>Oncidium tigrinum</i> a partir de protocormos tratados con soluciones antimitóticas	40
4.4 Desarrollo de plántulas de <i>Oncidium tigrinum</i> a partir de protocormos tratados con soluciones antimitóticas	42
4.5 Resultados del Número cromosómico	47
V. DISCUSION	49
VI. CONCLUSIONES	53
VII. LITERATURA CITADA	54

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Tratamientos con colchicina para inducir poliploidía en semillas y protocormos de <i>L. autumnalis</i> y <i>O. tigrinum</i>	21
2	Tratamientos con orizalina para inducir poliploidía en semillas y protocormos de <i>L. autumnalis</i> y <i>O. tigrinum</i>	22
3	Análisis de varianza para el efecto de los factores agente antimitótico, dosis y tiempo sobre la viabilidad de semillas de <i>Laelia autumnalis</i>	26
4	Análisis de varianza para el efecto de los factores agente antimitótico, dosis y tiempo sobre la altura de plántulas provenientes de semillas de <i>Laelia autumnalis</i>	27
5	Análisis de varianza para el efecto de los factores agente antimitótico, dosis y tiempo sobre el número de hojas de plantas provenientes de semillas de <i>Laelia autumnalis</i>	29
6	Análisis de varianza para el efecto de los factores agente antimitótico, dosis y tiempo sobre el número de raíces de plántulas provenientes de semillas de <i>Laelia autumnalis</i>	31
7	Análisis de varianza para el efecto de los factores agente antimitótico, dosis y tiempo sobre la longitud de plántulas provenientes de semillas de <i>Laelia autumnalis</i>	33
8	Análisis de varianza para el efecto de los factores agente antimitótico, dosis y tiempo sobre la altura de plantas provenientes de protocormos de <i>Laelia autumnalis</i>	34
9	Análisis de varianza para el efecto de los factores agente antimitótico, dosis y tiempo sobre la altura de plántulas provenientes de protocormos de <i>Laelia autumnalis</i>	35
10	Análisis de varianza para el efecto de los factores agente antimitótico, dosis y tiempo sobre el número de hojas de plántulas provenientes de protocormos de <i>Laelia autumnalis</i>	37

11	Análisis de varianza para el efecto de los factores agente antimitótico, dosis y tiempo sobre el número de raíces de plántulas provenientes de protocormos de <i>Laelia autumnalis</i>	38
12	Análisis de varianza para el efecto de los factores agente antimitótico, dosis y tiempo sobre la longitud de raíces de plántulas provenientes de protocormos de <i>Laelia autumnalis</i>	39
13	Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto de los agentes antimitóticos sobre la viabilidad de semillas de <i>Oncidium tigrinum</i>	41
14	Cuadrados medios del análisis de varianza para el efectos de la colchicina y orizalina sobre la altura y número de hojas de plántulas de <i>Oncidium tigrinum</i>	43
15	Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto de la colchicina y orizalina sobre el número y longitud de raíces de plántulas de <i>Oncidium tigrinum</i>	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Flores de la orquídea <i>Laelia autumnalis</i>	7
2	Flores de la orquídea <i>Oncidium tigrinum</i>	8
3	Fotografía del edificio principal de la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez"	18
4	Polinización, cosecha y obtención de semillas de orquídeas de <i>Laelia autumnalis</i> y <i>Oncidium tigrinum</i>	19
5	Prueba de viabilidad en semillas de la orquídea <i>Laelia autumnalis</i>	20
6	Inducción de poliploidía en semillas de las orquídeas <i>L. autumnalis</i> y <i>O. tigrinum</i>	23
7	Prueba de tetrazolio de semillas de orquídeas	25
8	Porcentaje de viabilidad de semillas de <i>Laelia autumnalis</i> tratadas con agentes antimetabólicos	26
9	Altura de plántulas provenientes de semillas de <i>Laelia autumnalis</i> tratadas con agentes antimetabólicos	28
10	Número de hojas de plantas de <i>Laelia autumnalis</i> provenientes de semillas tratadas con agentes antimetabólicos	30
11	Efecto entre la interacción de los factores tiempo * dosis sobre el número de raíces de plántulas de <i>Laelia autumnalis</i> provenientes de semillas	31
12	Efecto entre la interacción de los factores tiempo * agente antimetabólico sobre el número de raíces de plántulas de <i>Laelia autumnalis</i> provenientes de semillas	32
13	Efecto entre la interacción de los factores tiempo * dosis * agente antimetabólico sobre el número de raíces de plántulas de <i>Laelia autumnalis</i> provenientes de semillas	33
14	Supervivencia de protocormos de <i>Laelia autumnalis</i> tratados con agentes antimetabólicos	35
15	Altura de plántulas de <i>Laelia autumnalis</i> provenientes de protocormos tratados con agentes antimetabólicos	36
16	Número de hojas en plantas de <i>Laelia autumnalis</i> provenientes de protocormos tratados con soluciones antimetabólicas	37
17	Número de raíces en plantas de <i>Laelia autumnalis</i> provenientes de protocormos tratados con soluciones antimetabólicas	38
18	Longitud de raíces en plantas de <i>Laelia autumnalis</i> provenientes de protocormos tratados con soluciones antimetabólicas	40
19	Viabilidad de semillas de <i>Oncidium tigrinum</i> tratadas con colchicina y orizalina	42
20	Efecto entre la interacción de los factores tiempo * dosis * agente antimetabólico sobre plántulas de <i>O. tigrinum</i> provenientes de protocormos	44

21	Número de raíces de plántulas de <i>Oncidium tigrinum</i> tratadas con colchicina y orizalina	46
22	Longitud de raíz de plántulas de <i>Oncidium tigrinum</i> tratadas con colchicina y orizalina	47
23	Conteo de cromosomas de <i>Laelia autumnalis</i>	48
24	Plantas potencialmente poliploides de <i>Laelia autumnalis</i>	48

RESUMEN

En los programas de mejoramiento genético, se ha incrementado el uso de germoplasma de plantas nativas silvestres que tienen potencial para la generación de plantas con características atractivas para el consumidor por las flores que generan, las cuales pueden tener nuevos rasgos en el color, la forma y el tamaño, su fragancia, con vida de florero mayor y, para el productor, por la tolerancia a tipos de estrés abiótico, así como por la resistencia a plagas y enfermedades. *Laelia autumnalis* y *Oncidium tigrinum* son dos especies de orquídeas mexicanas de gran potencial florícola y comercial, por lo que es necesario integrarlas a programas de mejoramiento genético. Actualmente los estudios en el país sobre la inducción de poliploidía en el mejoramiento genético de orquídeas, para la generación de nuevas variedades a partir de especies nativas de México son escasos, en especial aquellos que impacten positivamente el mercado florícola nacional y con los que se logre competir en los mercados internacionales. Por lo anterior el objetivo de esta investigación fue desarrollar procedimientos para la inducción *in vitro* de poliploidía en las orquídeas *Laelia autumnalis* y *Oncidium tigrinum*, utilizando sustancias antimitóticas. La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en Uruapan Michoacán y, como material vegetal fueron utilizadas semillas y protocormos de las orquídeas *L. autumnalis* y *O. tigrinum*, para exponerlos a soluciones de (compuestos con actividad antimicótica) Colchicina (0.05, 0.1 y 0.2%) y de Orizalina (0.004, 0.008 y 0.016%), durante tiempos de exposición de 1, 2, 4, 8 días. En cada caso fue utilizado un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial siendo las variables evaluadas: viabilidad de semillas, porcentaje de supervivencia, altura, número de hojas, número de raíces y longitud de raíces. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA) y una prueba de Tukey para la comparación de medias. Los resultados obtenidos indican que la viabilidad de semillas de las orquídeas *L. autumnalis* y *O. tigrinum* fue afectada por los tres factores de estudio, tipo de agente antimitótico, dosis y tiempo de exposición. Las semillas tratadas originaron plántulas de mayor longitud cuando estuvieron expuestas a concentraciones medias y altas de las sustancias antimitóticas durante un día (4.02 y 3.79 cm), mientras que el número de hojas estuvo influenciado por el tipo de compuesto antimitótico ya que las plantas obtenidas de

semillas tratadas con colchicina presentaron en promedio 4.1 hojas, mientras que con orizalina presentaron 3.98 hojas. El número de raíces estuvo influenciado por la concentración de la solución del compuesto antimetabólico, ya que se presentaron más raíces cuando se utilizaron dosis bajas, sin importar el tipo de agente antimetabólico. La supervivencia de protocormos se redujo cuando estos fueron expuestos a 8 días de exposición de las soluciones de los compuestos antimetabólicos o agua, pues solo se logró 61.3% de supervivencia. Los protocormos tratados de *L. autumnalis* y *O. tigrinum* desarrollaron plantas más altas al utilizar Orizalina (2.03 y 0.95 cm respectivamente), mientras que al utilizar colchicina la altura que presentaron fue de 1.7 (*L. autumnalis*) y 0.56 cm (*O. tigrinum*). Las variables número de hojas, número de raíces, se ven afectado por la concentración de la solución del compuesto antimetabólico, pues conforme aumenta la concentración, el número de hojas disminuye hasta 22%, el número raíces hasta 49%. Conclusión: Los agentes antimetabólicos Colchicina y Orizalina afectan la viabilidad de las semillas y la supervivencia de protocormos de las orquídeas *L. autumnalis* y *O. tigrinum*. La interacción de los tipos de compuestos antimetabólicos, las concentraciones de las soluciones y el tiempo de exposición afectan la altura, número de hojas, número y longitud de raíces de plántulas originadas de semillas y protocormos de *L. autumnalis* y *O. tigrinum*.

Palabras clave: Orchidaceae, agentes antimetabólicos, germoplasma nativo, mejoramiento genético, floricultura

ABSTRACT

The usage of wild native plants germplasm, that has potential for developing plants with attractive characteristics for customers due to their flowers have been increased in breeding programs, which novel traits on color, shape and size, fragrance, longer vase life, tolerance to sort of abiotic stresses, as well as pests and diseases resistance can be obtained. *Laelia autumnalis* and *Oncidium tigrinum* are two Mexican orchid species which have great floriculture and commercial potential, so integrate them into breeding programs are necessary. Current studies about polyploidization induction on breeding orchids in the country for developing of new varieties from native species of Mexico are rare, especially those ones which impact on national floriculture market positively and make possible the competition in international markets. Therefore, the aim of the study was to develop polyploidization induction procedures *in vitro* on *L. autumnalis* and *O. tigrinum* orchids using antimitotic substances. The research was carried out at the *in vitro* Plant Tissue Laboratory of the Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" of the Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, in Uruapan Michoacán and, seeds and protocorms from *L. autumnalis* and *O. tigrinum* orchids were used as plant material, they were immersed in solutions of (antimitotic agents compounds) colchicine (0.05, 0.1 y 0.2%) and oryzalin (0.004, 0.008 y 0.016%), for 1, 2, 4 and 8 days of exposure. An experimental design was completely randomized in each experiment with factorial arrangement, the evaluated variables were: seed viability, survival percentage, height, number of leaves, number of roots and length of roots. The data were analyzed through analysis of variance (ANOVA) and the means comparison with the Tukey test. The results show that viability seeds of the orchids *L. autumnalis* and *O. tigrinum* were affected by the three study factors, antimitotic agent, doses and exposure time. Seedlings length from treated seeds were increased by half and high antimitotic concentrations (4.02 and 3.79 cm), while the number of leaves were affected by antimitotic agent since obtained seedlings from seeds treated with colchicine that showed on average of 4.1 leaves, while 3.98 leaves were obtained by oryzalin. The number of roots were affected by antimitotic concentration, since more roots (2 roots) were observed at low concentrations, regardless the type of antimitotic agent. Protocorms survival were reduced at antimitotic agents or

water for 8 days, since survival rate of 61.3 % were achieved. Number of leaves and roots variables were affected by antimitotic agent, since the higher the concentration the decrease number of leaves up to 22 % and number of roots up to 49 %. Conclusion: Viability seeds and protocorms survival of *L. autumnalis* and *O. tigrinum* orchids were affected by colchicine and oryzalin. The height, number of leaves, number of roots and length roots of seedlings and protocorms from *L. autumnalis* and *O. tigrinum* were affected by the interaction of types of antimitotic agents, the solution concentrations and exposition time.

Keywords: Orchidaceae, antimitotic agents, native germplasm, genetic improvement, floriculture

I. INTRODUCCIÓN

La industria de la flor a nivel internacional produce plantas ornamentales en maceta o flor de corte con valor de 50 billones de euros aproximadamente en 2011 (Lûtken *et al.*, 2012). Entre estas especies se encuentran las orquídeas que son plantas atractivas por las formas y colores de la flor.

La mayoría de las orquídeas comerciales son híbridos desarrollados por métodos de mejoramiento (Vij y Pathak, 2012), con flores de rasgos novedosos en el color y la forma, fragantes con mayor vida de florero, tolerancia a estrés abiótico, resistencia a plagas y enfermedades (Teixeira *et al.*, 2011).

Los distintos gustos de las personas y su percepción por la belleza han sido un estímulo para que los fitomejoradores generen formas nuevas de flores y plantas ornamentales (Kuzichev y Kuzicheva, 2016). La mayoría de los programas de mejoramiento genético utilizan el germoplasma de poblaciones silvestres como fuente de variación para mejorar los cultivares existentes y desarrollar otros nuevos (Seaton *et al.*, 2014). La producción de variedades mejoradas reduce los costos de producción y ofrece plantas más atractivas y menos costosas para su uso en la producción de flores de corte, en maceta o para jardinería (Wilkins y Anderson, 2006).

La producción de orquídeas se concentra en Brasil, China, Costa Rica, Estados Unidos, Países Bajos, Tailandia, Filipinas e Indonesia. La participación de México en el comercio mundial de orquídeas no corresponde con las ventajas que el país posee como son la ubicación geográfica para la comercialización de orquídeas hacia EE.UU. y Canadá, así como la infraestructura sólida en investigación biotecnológica de plantas (Garibay, 2015); además, el cultivo depende de variedades desarrolladas en el exterior lo que origina

costos de producción elevados y reduce los ingresos del productor por el pago de regalías. Por esto, es necesario plantear programas de mejoramiento genético para generar variedades mexicanas de orquídeas a partir de especies nativas que tienen alto potencial florícola y comercial como *Laelia autumnalis* y *Oncidium tigrinum*.

El mejoramiento genético de orquídeas a través de métodos tradicionales es un proceso costoso que requiere mucho tiempo (Teixeira *et al.*, 2011). Por lo tanto, es imprescindible el uso de técnicas como el cultivo *in vitro* que permitan aumentar la eficiencia del mejoramiento de los cultivos económicamente importantes con ciclos biológicos muy largos como las orquídeas (Hossain *et al.*, 2013). Estas técnicas combinadas con la poliploidía forman una herramienta valiosa para acelerar los programas de fitomejoramiento.

El mejoramiento por poliploidía es un método para duplicar el número de cromosomas de una especie, encontrar variaciones genéticas y observar cambios en la morfología y la citología de la planta. Los individuos tetraploides son más vigorosos, más grandes, pueden producir hojas verdes oscuras y gruesas, y pueden presentar aumento en el tamaño de las hojas, ramas, partes de flores, frutos y semillas (Kazi *et al.*, 2015).

La poliploidía se lleva a cabo por medio de agentes antimitóticos, como la colchicina y la orizalina, que inducen la duplicación de cromosomas; la técnica depende de variables como el tipo de agente antimitótico, la concentración, el tiempo de exposición, así como los tipos de medio de cultivo y de los explantes (Dhooghe *et al.* 2011). Para detectar la poliploidización, se debe generar un protocolo de confirmación por medio de citometría de flujo, aunque también se utilizan métodos alternativos como son el conteo de cromosomas, y las observaciones morfológicas de las plantas (Dhooghe *et al.*, 2009).

Actualmente son escasos los estudios en el país sobre la inducción de poliploidía en el mejoramiento genético de orquídeas, para la generación de nuevas variedades a partir de especies nativas de México, que impacten positivamente el mercado florícola nacional y se logre competir en los mercados internacionales.

Objetivo general

Desarrollar protocolos para la inducción *in vitro* de poliploidía en las orquídeas *Laelia autumnalis* y *Oncidium tigrinum* utilizando sustancias antimitóticas.

Objetivos específicos

Conocer el nivel de ploidía de las especies *L. autumnalis* y *O. tigrinum*.

Determinar la dosis de concentración y tiempo de exposición de orizalina y colchicina para semillas y protocormos de *L. autumnalis* y *O. tigrinum*.

Estudiar el desarrollo *in vitro* de plántulas de *L. autumnalis* y *O. tigrinum* obtenidas de semillas y protocormos expuestos a dichas sustancias antimitóticas.

Hipótesis

La exposición de semillas y protocormos a los agentes antimitóticos genera diferentes respuestas morfogénicas en las plántulas de *L. autumnalis* y *O. tigrinum*

II. REVISIÓN DE LITERATURA

La floricultura es una de las industrias de mayor crecimiento en los últimos años, y ha aumentado significativamente la economía de países productores como los Países Bajos, Tailandia, Filipinas, Indonesia, Brasil, China, Costa Rica, Estados Unidos. Estos países han generado valores de hasta 50 billones de euros por la comercialización y exportación de flor de corte y maceta (Lütken *et al.*, 2012, Mebakerlin y Chakravorty, 2015), para su uso en cosméticos, perfumería, farmacéutica, así como la decoración de interiores y ceremonias religiosas.

Al expandirse el mercado mundial de plantas ornamentales, crece la constante necesidad de innovación (Botelho *et al.*, 2015). Estas plantas son mejoradas en sus características externas como flores con formas distintas, colores y arquitectura; aunque también son importantes las características internas, que no son visibles, pero influyen en el desarrollo de las plantas como la resistencia al estrés biótico y abiótico, así como el mejoramiento para la calidad postcosecha (Kuligowska *et al.*, 2016).

2.1 Importancia de las orquídeas

La familia Orchidaceae es una de las familias más grandes de plantas con flores en el mundo, ya que se encuentra en todos los continentes excepto en la Antártida. Tan sólo en el 2016, el número de géneros fue de 736 con 28,000 especies, pero este número aumenta cada año (Christenhusz y Byng, 2016). En México actualmente se reconocen 1,263 especies de orquídeas, distribuidas en 170 géneros, con un porcentaje de endemismo del 46% (Espejo, 2012; Dressler, 2005), de las cuales 188 especies están registradas en alguna categoría de riesgo en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010 (SEMARNAT, 2010).

La familia Orchidaceae tiene la gran ventaja de contar con más de 25000 especies silvestres que se pueden utilizar para crear cientos de nuevas variedades (Givnish *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2014), ya que son uno de los grupos de plantas más interesantes para la generación de híbridos, tan solo en 2011 la Royal Horticultural Society registró 250 000 cultivares y más de 106 000 híbridos, tanto naturales como artificiales (Hossain *et al.*, 2013).

Las orquídeas son conocidas, cultivadas y comercializadas como plantas ornamentales, por su belleza exótica, larga duración de sus flores y su aroma (Popova *et al.*, 2016), así como productos medicinales y alimentos, comercio que se da de manera legal o ilegal, sustentable o convencional, además esta venta puede tener escalas local, nacional o internacional (Hinsley *et al.*, 2017). Debido a esto, las poblaciones silvestres de las orquídeas son las más susceptibles a las perturbaciones como la extracción masiva de ejemplares (Pantoja-Ambriz *et al.*, 2016).

Así mismo es importante reconocer el uso tradicional de orquídeas por parte de las comunidades indígenas y mestizas en México, para satisfacer las necesidades sociales de importancia ceremonial como parte de las tradiciones culturales que se han heredado de generación en generación (Solano *et al.*, 2010). Por ejemplo, las flores del género *Laelia* se utilizan como adorno en diversas festividades religiosas, es por ello que se les conoce como “flores sagradas” (Emeterio-Lara *et al.*, 2016), en el caso de *Laelia autumnalis*, Hernández-Muñoz *et al.* (2017), menciona que es una orquídea con valor ornamental alto, pero su comercialización se restringe porque las variedades con calidad comercial no existen. Es por esto que se cosechan las inflorescencias de poblaciones silvestres para su uso en el arreglo de altares de las festividades del “día de Muertos” (26 de octubre - 02 de noviembre), celebración mexicana de origen indígena que honra a los

difuntos, el costo por inflorescencia varía entre los \$5.00 y los \$25.00 pesos mexicanos (Martínez-Rivera y Beltrán-Rodríguez, 2009; Martínez-Rivera *et al.*, 2010).

La introducción de orquídeas silvestres con atributos ornamentales a programas de mejoramiento, propagación masiva y metas comerciales es un reto muy difícil, ya que se requiere una basta y extensa red de investigaciones, de protocolos de propagación, manejo hortícola, mejoramiento o transformación genética, entre otras técnicas. Se considera que el mejoramiento, propagación y comercialización de las especies promoverá la circulación de las plantas en la sociedad para desalentar su extracción ilegal e incontrolada de los hábitats naturales (Tejeda-Sartorius *et al.*, 2017), como por ejemplo de orquídeas con potencial ornamental como son *Laelia autumnalis* y *Oncidium tigrinum*.

2.1.1 *Laelia autumnalis*

Esta orquídea presenta hábitos de crecimiento como litófito es decir puede crecer directamente sobre rocas y acantilados expuesta al sol y a fuertes vientos, el otro hábito como epífita, se le ve creciendo sobre encinos (*Quercus rugosa* y *Q. crassipes*) y enebros (*Juniperos flaccida*). Su época de floración es entre septiembre y noviembre (Szeszko, 2011). Las flores tienen forma de arco, piramidal, estrella o estrella de David (Figura 1), con fragancia muy aromática, con mayor intensidad por las mañanas (Hernández, 2012). Las flores de *L. autumnalis* se utilizan para adornar tumbas e iglesias el día de muertos.

Se conoce como “flor de muertos”, en referencia a su época de floración, también como “catarina” o “plátano de encino”.



Figura 1. Flores de la orquídea *Laelia autumnalis*

2.1.2 *Oncidium tigrinum*

Esta orquídea crece en bosques de encino y pino-encino en donde los árboles están espaciados, con alta intensidad luminosa e incluso puede estar expuesta al sol directo, por lo que crece en ramas muy altas o en las laderas de los cerros. Su época de floración es al término de la época de lluvias, entre octubre y diciembre, presenta flores con sépalos y pétalos de color amarillo-verdoso, con manchas irregulares color pardo-rojizo, con labelo, callo y columna de color amarillo, con un aroma agradable a violetas (Figura 2). Por su época de floración se le conoce como “flor de muertos” (Szeszko, 2011). Debido a lo raro de sus flores, las plantas se recolectan de manera inmoderada, por lo que sus poblaciones se vean severamente afectadas. En consecuencia *O. tigrinum* está incluida en la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010).



Figura 2. Flores de la orquídea *Oncidium tigrinum*

2.2 Mejoramiento genético de orquídeas

Los programas de mejoramiento de orquídeas están encaminados al atributo más atractivo, es decir su flor, por lo que la atención se centra en el color, tamaño, forma, aroma y periodo de vida. Aunque también debe tomarse en cuenta las características agronómicas, como crecimiento, vigor, respuesta a la fertilización, facilidad de cultivo y propagación, resistencia a plagas y enfermedades, adaptabilidad a diferentes regiones de cultivo, porque estos factores influyen en los procesos de inducción floral y desarrollo de la planta; además del aspecto innovador del cultivar, que lo hace interesante desde el punto de vista comercial y productivo (Cardoso, 2010).

La hibridación se ha utilizado en el mejoramiento de orquídeas en varias ocasiones, ya que es el proceso por el cual se origina la recombinación de genes, y esto podría ser muy favorable para enaltecer características florales y así obtener nuevos cultivares (Marques

et al., 2014), por ejemplo en los géneros *Spathoglottis* (Suárez, 2014), *Cattleya* (Cardoso *et al.*, 2016; Colombo *et al.*, 2017), *Epidendrum* (Devadas *et al.*, 2010), aunque también se han identificado la generación de híbridos en los sistemas naturales como la cruce entre *Dactylorhiza praetermissa* y *Gymnadenia borealis* (Bateman *et al.*, 2017), o los híbridos naturales entre *Prosthechea cochleata* y *Prosthechea radiata* (Beutelspacher y Moreno-Molina, 2014).

La inducción de mutaciones por medio de agentes mutagénicos físicos o químicos, es útil para generar nuevos cultivares de orquídeas. Actualmente se usa la radiación ionizante, como los rayos gamma en combinación con técnicas de cultivo *in vitro* para inducir nuevas variaciones genéticas en las plantas (Lee *et al.*, 2016). Estos métodos se han utilizado en las orquídeas *L. autumnalis* (Hernández-Muñoz *et al.*, 2017), *Cymbidium* (Lee *et al.*, 2016), *Paphiopedilum* (Uyen y Ha, 2012), así como el uso de azida de sodio (NaN₃) en *Dendrobium* “Earsakul”, para mejorar la calidad y el rendimiento (Wannajindaporn *et al.*, 2016).

En algunas orquídeas micropropagadas se puede presentar cambios morfológicos o fisiológicos como formas de mosaico en las hojas, hojas anchas o distorsionadas, esto debido a la variación somaclonal que ocurre durante la proliferación de brotes y PLBs. Estos cambios en los regenerantes, ayudan a la selección de genotipos valiosos y novedosos (Sheela y Sheena, 2014), tal es el caso de *Phalaenopsis* “Spring Dancer” (Hyun-Jeong *et al.*, 2016) y “Wedding Promenade” (Hyun-Jeong *et al.*, 2017).

Otro método de mejoramiento para las orquídeas es el aislamiento de protoplastos y la hibridación somática, donde se pueden obtener y desarrollar nuevas plantas, pero

requiere de protocolos específicos y estudios para la fusión de protoplastos (Aqeel *et al.*, 2016).

En la actualidad, la ingeniería genética es una estrategia para el mejoramiento molecular de orquídeas, las técnicas con más éxito son la transformación por medio de *Agrobacterium* y el bombardeo de partículas (Teixeira *et al.*, 2011). Estas técnicas se han aplicado con éxito en *Phalaenopsis* (Hong-Xian *et al.*, 2016), *Dendrobium* (Teixeira *et al.*, 2016) y *Erycina pusilla* (Shu-Hong *et al.*, 2015).

2.3 Mejoramiento genético mediante poliploidía

La poliploidía es un fenómeno en las plantas que consiste en la duplicación del número de cromosomas; este mecanismo ha desempeñado un papel importante en la evolución y la especiación de las plantas (Ranney, 2006).

La poliploidía es considerada un método de mejoramiento importante, pues los organismos poliploides tienen un vigor mayor y en algunos casos son superiores a los individuos diploides de la misma especie en características como mayor rendimiento, mejor calidad del producto, aumento en la tolerancia al estrés biótico y abiótico (Sattler *et al.*, 2016).

Para aumentar los niveles de ploidía se utilizan diferentes agentes antimitóticos entre los que se encuentra, la colchicina, herbicidas del tipo dinitroanilinas, trifluralina y orizalina, amidas fosfóricas como amiprosfometilo y butamifos (Dhooghe *et al.*, 2009). Estos se utilizan ya que como agentes antimitóticos actúan uniéndose a los dímeros de tubulina, evitando la formación de microtúbulos durante la división celular (Zhou *et al.*, 2017).

El éxito para obtener individuos poliploides *in vitro* depende de muchos factores, como la preexistencia de un protocolo bien establecido para la regeneración *in vitro* de la especie, el tipo y la concentración del agente antimitótico, el tiempo de exposición, el método de aplicación de la solución antimitótica y el tipo de explante (Sattler *et al.*, 2016).

2.3.1 Soluciones antimitóticas

La colchicina es un alcaloide extraído del azafrán del prado (*Colchicum autumnale* L.) y contiene una fórmula molecular $C_{22}H_{25}NO_6$, con un peso molecular de $399.437 \text{ g mol}^{-1}$. Esta sustancia es la más usada en el mejoramiento por poliploidía debido a que no reduce sus capacidades después de haber sido esterilizada en autoclave comparada con la orizalina (Zhang *et al.* 2007). Sin embargo, en muchas especies de plantas, la colchicina causa efectos secundarios, como esterilidad y crecimiento anormal; además esta sustancia es muy tóxica para los seres humanos, debido a su afinidad alta a los microtúbulos de las células animales, mientras que con las plantas su unión es muy pobre, por lo que debe ser utilizada en concentraciones altas.

La orizalina (Bencenosulfonamida, 4-(dipropilamino)-3,5-dinitro) $C_{12}H_{18}N_4O_6S$, con un peso molecular de 346.4 g mol^{-1} . Es una sustancia química que se utiliza como herbicida, tiene más afinidad por los dímeros de la tubulina vegetal, y por lo tanto puede ser utilizada en concentraciones más bajas, reduciendo significativamente la toxicidad para los seres humanos (Morejohn *et al.*, 1987).

2.3.2 Tejido vegetal

La selección del tipo de explante es importante para el mejoramiento por medio de la inducción de poliploidía, en el caso de las orquídeas, éstas producen cápsulas que contienen pequeñas semillas de 0.1 – 6 mm, denominadas semillas polvo, las cuales se

caracterizan por la ausencia de endospermo (Barthlott *et al.*, 2014). El embrión de una semilla de orquídea es muy pequeño y a menudo se describe como "globular", lo que implica que el embrión está poco desarrollado y organizado, lo cubre una testa que se compone de unas pocas capas de células sin tejido vascular presente. Tras la germinación, el embrión se desarrolla primero en un protocormo antes de formar una plántula, la capacidad de las células apicales de estos protocormos los convierte en explantes ideales para su micropropagación y estudios de mejoramiento genético, ya que estas células aún conservan propiedades embriogénicas en condiciones apropiadas de cultivo *in vitro* (Yeung, 2017).

2.4 Variedades ornamentales obtenidas por poliploidía

La inducción de poliploidía se ha aplicado con éxito en plantas ornamentales para obtener líneas que muestren características agronómicas nuevas (Tamayo-Ordóñez *et al.*, 2016). En anturio (*Anthurium andraeanum*), se obtuvieron plantas tetraploides, a partir de tejido de raíces diploides tratado con colchicina en diferentes concentraciones (0, 0.1, 0.2, 0.3 %) durante 3, 5, 7 horas; el cultivo de raíces se efectuó *in vitro* en un medio Murashige y Skoog con 3 mg L⁻¹ de BAP y 0.2 mg L⁻¹ de 2,4-D. Las concentraciones altas del antimitótico y la duración mayor redujo la tasa de supervivencia de los explantes (74.5 %). Las plantas tetraploides se obtuvieron en todos los tratamientos, pero fue mayor en el tratamiento con 0.3 % de colchicina con 7 horas de exposición (7.6 %). En esta especie también se confirmó que el tamaño de los estomas de las plantas tetraploides fue más grande 12.2 µm más que en las plantas diploides; sin embargo, la densidad estomática fue menor (36 %) que en las plantas diploides. Las plantas tetraploides desarrollaron pecíolos más fuertes, más gruesos, hojas de color verde intenso y espatas más gruesas (Chen *et al.*, 2011).

En vitroplántulas de *Alocasia* ($2n=28$), la formación de tetraploides se indujo con distintos tratamientos de colchicina (0, 0.01, 0.05, 0.1%) y orizalina (0.005, 0.01, 0.05%) con un tiempo de exposición de 24, 48 y 72 horas. De las 396 plántulas regeneradas, se encontraron 22 tetraploides y 22 quimeras, estos niveles de ploidía se determinaron por el método de citometría de flujo. El tratamiento mejor para inducir tetraploides fue con 0.01 % de orizalina con un tiempo de exposición de 24 h. También se observaron diferencias morfológicas en la forma de la hoja, las plantas diploides presentaban hojas alargadas en forma de corazón, y las plantas tetraploides y quimeras tendían a ser redondas (Phuong *et al.*, 2003).

La capacidad de los agentes antimitóticos colchicina, orizalina y trifluralina también se ha confirmado en *Ranunculus asiaticus*. El porcentaje mayor de poliploidización (27.5%) se obtuvo con trifluralina 2 μ M, seguido por la colchicina a 200 μ M que indujo el 23.3% de poliploides, mientras que para orizalina el porcentaje mayor (32.5%) de poliploidización alcanzado fue con una concentración de 1 μ M. El periodo de exposición máximo de las pruebas fue de 10 semanas, esto dio lugar a un aumento significativo de poliploidización por los agentes orizalina y trifluralina. Estos datos fueron confirmados por el método de citometría de flujo y contando cromosomas en las células de la punta de la raíz (Dhooghe *et al.*, 2009).

En orquídeas está bien documentado el uso exitoso de la colchicina y la orizalina para convertir plantas diploides a formas tetraploides. En semillas diploides de la orquídea del género *Calanthe* se obtuvieron 49 individuos tetraploides cuando se sometieron a distintas concentraciones de colchicina (0, 0.05, 0.1%), con una exposición de 0, 3 y 7 días, mientras que para orizalina solo se utilizó una concentración al 0.003% con 1, 2, 4, 7 días de exposición. El tratamiento con mayor éxito para inducir tetraploides fue con

0.003% de orizalina con un tiempo de exposición de 1 o 2 días. La ploidía de las plántulas se determinó por citometría de flujo. Las pruebas citológicas y morfológicas mostraron que las plantas tetraploides tenían mayor densidad y tamaño de estomas, y presentaban hojas anchas, mientras que los individuos diploides presentaban hojas alargadas (Mi *et al.*, 2014).

En la orquídea *Dendrobium chrysotoxum*, cuerpos como protocormos (PLB`s) cultivados en un medio de cultivo Vacint y Went (VW) semisólido, se expusieron a distintas concentraciones de colchicina (0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 y 0.05%), durante 1, 2, 3, 4 y 5 días. La respuesta mejor se logró con la exposición durante un día a colchicina 0.04%, ya que 84 % de PLB`s sobrevivieron y 47 % de éstos fueron tetraploides, esto medido por el método de citometría de flujo (Atichart, 2013).

Para los géneros de orquídeas *Dendrobium*, *Epidendrum*, *Odontioda*, *Phalaenopsis* y *Cymbidium* se utilizaron protocormos y PLB`s sometidos a distintas concentraciones de orizalina (0, 14.4 μ M, 28.9 μ M, 57.7 μ M) expuestas durante 3 y 6 días. Las concentraciones y tiempo de exposición más altos bajaron las tasas de supervivencia de los explantes (21.4 % en *Cymbidium*, 20 % en *Dendrobium*, 41.4 % en *Epidendrum*, 80 % en *Odontioda*, 81.4 % en *Phalaenopsis*), pero indujeron el número mayor de poliploides para cuatro de las especies estudiadas (tres en *Dendrobium*, dos en *Epidendrum*, tres en *Odontioda*, tres en *Phalaenopsis*). Los tratamientos óptimos fueron: 14.4 μ M durante seis días para *Dendrobium* y *Odontioda*; 57.7 μ M durante seis días para *Epidendrum*; y 14.4 μ M durante seis días para *Phalaenopsis* (Tilden y Kenneth, 2011).

2.5 Registro de variedades vegetales

Cuando se obtiene una variedad por cualquier método de mejoramiento vegetal, esta debe cumplir con las condiciones de ser novedosa, distinta, homogénea y estable. Al cumplir con las condiciones necesarias, se puede registrar mediante una solicitud de título de obtentor que otorga un derecho temporal de explotación exclusiva, el cual se rige por la Ley federal de Variedades Vegetales (LFVV) de 1996, y concuerda con el acta de 1978 del convenio de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV), al que México se adhirió en Julio de 1997 (SNICS, 2016).

Los Requisitos que establece la Ley Federal de Variedades Vegetales, para que una variedad sea objeto de protección son la novedad, distinción, estabilidad y homogeneidad.

Una especie es novedosa cuando no se ha enajenado en territorio nacional o extranjero, un año anterior o seis años respectivamente a la fecha de presentación de la solicitud de título de obtentor. El requisito de distinción se cumple cuando la variedad vegetal tiene uno o varios caracteres que la diferencien técnica y claramente de cualquier otra variedad, cuya existencia sea conocida en el momento en que se solicite la protección.

Para ser considerada estable, la variedad vegetal tiene que conservar de manera inalterada los caracteres que la hacen distinta después de reproducciones o propagaciones sucesivas. Si la variedad es suficientemente uniforme en sus caracteres pertinentes, a reserva de la variación previsible por su reproducción sexuada o multiplicación vegetativa, se cumple con el requisito de homogeneidad.

Además, su denominación será considerada como su designación genérica, para ser aprobada debe ser diferente a cualquier otra existente en el país o en el extranjero,

cumplir con los demás requisitos establecidos de esta ley, y no ser idéntica o similar en grado de confusión a una previamente protegida.

Una vez que la solicitud presentada ha cumplido con los requisitos anteriores la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), otorga la constancia de presentación al titular de ser considerado el obtentor de la variedad vegetal. También en la Ley Federal de Variedades Vegetales prevé procedimientos como nulidad, revocación e imposición de sanciones.

La Ley federal de Variedades Vegetales, establece que los derechos de obtentor tendrán una duración de 18 años para especies perennes (forestales, frutícolas, vides, ornamentales) y sus portainjertos, y 15 años para las especies no incluidas en el inciso anterior, estos plazos se cuentan a partir de la expedición del título de obtentor y una vez transcurrido este tiempo, la variedad vegetal, su aprovechamiento y explotación, pasan al dominio público (SNICS, 2016).

Actualmente en el catálogo nacional de variedades vegetales se encuentran registradas 74 variedades ornamentales de las cuales 30 variedades son de Cempoalxóchitl (*Tagetes ssp.*) (Acuexcomac, Alma, Alto, Angel, Atlautla, Ayutla, Chapingo, Coatlinchan, Coyutepec, Ecatzingo, Gabriel, Hidalgo, Huejutla, Itarichen, Jeronimo, Josefina, Lucia, Milagros, Ofelia, Sofia, Tecuanulco, Teotihuacan, Tepeaca, Tepozteco, Tepoztlan, Tequexquinahuac, Tlalamac, Toluca, Tzapingo, Yacochi), tres de Crisantemo (*Chrysanthemum ssp.*) (Fito-001, OOT-1, Sheena), nueve de Dalia (*Dhalia ssp.*) (Alegria, Beso de agua, Chinita, Ileri, Quinceañera, Ramo de novia, Rayito de sol, San Luis, Sandia), cinco variedades de Echeveria (*Echeveria ssp.*) (Helena, Koltik, Quilpall, Quiltic, Tememetla), cinco de Lirio Azteca (*Sprekelia ssp.*)

(Andrea, Anna, Julia, Oasis, Terciopelo), 12 de Nochebuena (*Euphorbia* ssp.)
(Amanecer navideño, Anna, Belen, Corona, Estrella, Juan Pablo, Marysia, Rehilete,
Tete, Tlachco, Valenciana, Valsu), una variedad de Syngonio (*Syngonium* sp.) (Pixie),
nueve de Tigridia (*Tigridia* ssp) (Angeles, Carolina, Dulce, Gloria, Mariana, Penelope,
Samaria, Sandra, Trinidad).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del sitio experimental

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en Uruapan Michoacán (Figura 3).



Figura 3. Fotografía del edificio principal de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”.

3.2 Material vegetal

Se utilizaron plantas nativas del estado de Michoacán de las especies *L. autumnalis* y *O. tigrinum*, pertenecientes al invernadero de Conservación de Germoplasma de Orquídeas Nativas de la Facultad de Agrobiología y se realizaron hibridaciones por polinización manual para cada una de las especies (10 flores por especie), la cosecha de cápsulas se

realizó según el tiempo de maduración para cada especie; *L. autumnalis* tres meses, *O. tigrinum* 12 meses (Figura 4).



Figura 4. Polinización, cosecha y obtención de semillas de orquídeas de *L. autumnalis* y *O. tigrinum*. A) polinización de *L. autumnalis*, B) polinización de *O. tigrinum* C) capsulas de *L. autumnalis*, D) capsulas de *O. tigrinum* E) Extracción de semillas de *L. autumnalis*

Una vez cosechadas las cápsulas se realizó una prueba de tetrazolio para conocer la viabilidad de las semillas (Figura 5); para esto se tomaron 5 mg de semillas de cada especie las cuales se colocaron 24 h en imbibición, luego se extrajo el agua y se agregó solución de 2,3,5 trifenil de tetrazolium al 1 %, y se incubaron a 40 °C durante 24 h, para después observarlas en un microscopio óptico e identificar las semillas viables por su coloración roja; se cuantificó el número de semillas en la cuales se tiñó el embrión y el número de semillas sin tinción, para obtener el porcentaje de semillas viables y no viables. Con la suma de las semillas teñidas y sin teñir se obtuvo el número total de semillas, que se usó como denominador para obtener el porcentaje de semillas viables de la siguiente forma: % de semillas viables = (número de semillas teñidas/número total de semillas) x 100.

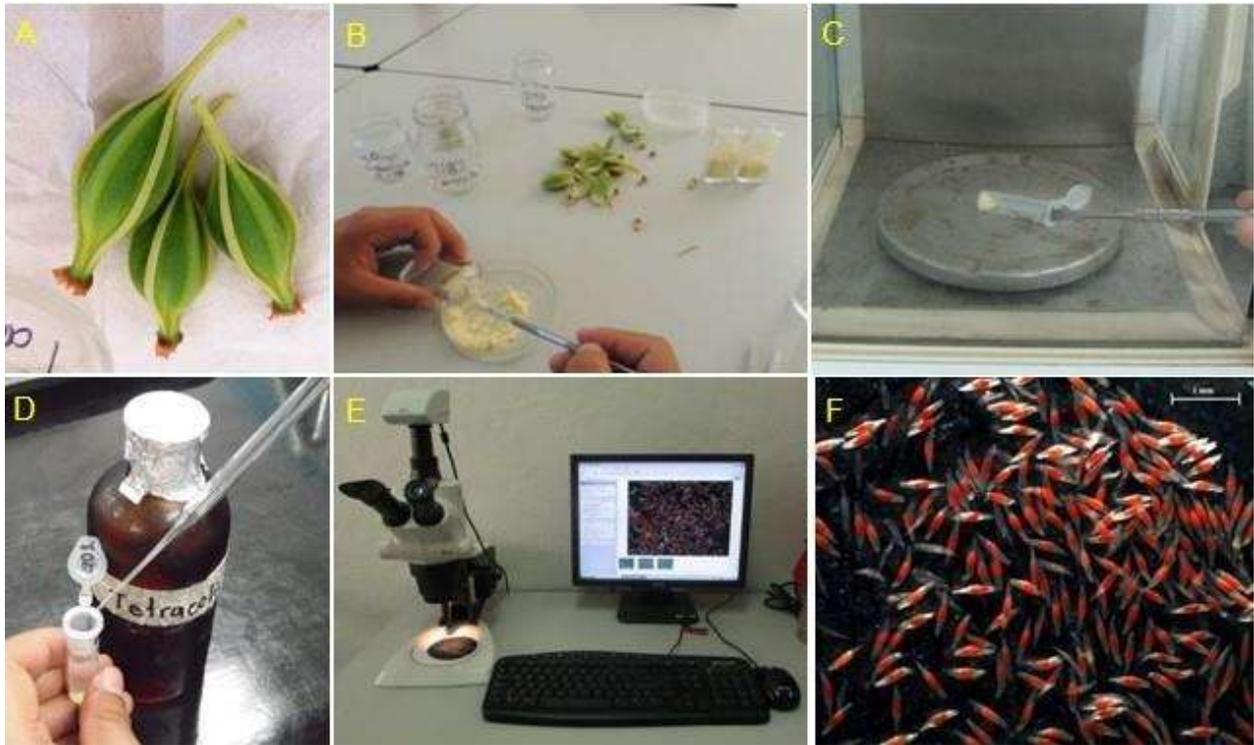


Figura 5. Prueba de viabilidad en semillas de la orquídea *L. autumnalis*. A) capsulas de *L. autumnalis*, B), C) peso de la semilla, D) prueba de tetrazolio, E) y F) observación y conteo de las semillas viables

Para los experimentos, se usaron muestras de semillas de 15 mg, las cuales se colocaron en sobres de papel filtro, para el caso de los experimentos de protocormos, las semillas se sembraron por el método de la jeringuilla y se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 15 % (v/v) (i.a. 6 %) durante 15 min y en la campana de flujo laminar, las semillas se enjuagaron tres veces con agua estéril se sembraron en frascos de cristal con capacidad de 120 mL y tapa de polipropileno con 20 mL de medio Murashige y Skoog (1962) (MS basal), adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 0.4 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de inositol y 6 g L⁻¹ de agar. El pH se ajustó a 5.7 con NaOH y H₂SO₄ 1 N y se esterilizaron en una autoclave de vapor a 1.5 kg/cm² de presión y 121 °C durante 15 min. Las semillas sembradas se incubaron bajo un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas

obscuridad, con una temperatura de 22 ± 1 °C y una intensidad lumínica de $40 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A los 30 días se obtuvieron protocormos de la especie *L. autumnalis* y los 80 días se obtuvieron protocormos de la especie *O. tigrinum*.

3.3 Inducción de poliploidía

Las semillas (15 mg) y protocormos (200) de las especies *L. autumnalis* y *O. tigrinum*, se sometieron 16 tratamientos conformados por la combinación de distintas dosis de los agentes antimitóticos colchicina y orizalina durante 1, 2, 4 y 8 días (Cuadros 1 y 2). Se probaron cuatro tratamientos testigo en donde las semillas se imbibieron solo en agua destilada estéril. Los explantes se colocaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad con 20 mL de la dosis del agente antimitótico y se agitaron a 70 RPM en un agitador Lumistell A0P-70. La colchicina que se usó fue marca Sigma®, como fuente de orizalina se utilizó surflan pro® (Agricel) (Figura 6).

Cuadro 1. Tratamientos con colchicina para inducir poliploidía en semillas y protocormos de *L. autumnalis* y *O. tigrinum*

Tratamiento	Colchicina		Tiempo (Días)
	%	μM	
1	0	0	1
2	0	0	2
3	0	0	4
4	0	0	8
5	0.05	1316.84	1
6	0.05	1316.84	2
7	0.05	1316.84	4
8	0.05	1316.84	8
9	0.1	2634.93	1
10	0.1	2634.93	2
11	0.1	2634.93	4
12	0.1	2634.93	8
13	0.2	5269.87	1
14	0.2	5269.87	2

Cuadro 2. con orizalina poliploidía en protocormos de <i>L. autumnalis</i> y <i>O. tigrinum</i>	15	0.2	5269.87	4	Tratamientos para inducir semillas y
	16	0.2	5269.87	8	

Tratamiento	Orizalina		Tiempo (Días)
	μM	%	
1	0	0	1
2	0	0	2
3	0	0	4
4	0	0	8
5	120	0.0021	1
6	120	0.0041	2
7	120	0.0041	4
8	120	0.0041	8
9	240	0.0083	1
10	240	0.0083	2
11	240	0.0083	4
12	240	0.0083	8
13	480	0.016	1
14	480	0.016	2
15	480	0.016	4
16	480	0.016	8

Después de la aplicación de los tratamientos en la campana de flujo laminar, se extrajeron los agentes antimitóticos a través de un filtro de porcelana y una bomba de vacío; posteriormente, los explantes se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se dejaron secar para retirar el exceso de agua. La siembra se efectuó en frascos de 120 mL con 20 mL medio de cultivo MS al 50% adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 100 mg L⁻¹ de inositol y 0.4 mg L⁻¹ de tiamina. La incubación se efectuó bajo las condiciones descritas anteriormente.



Figura 6. Inducción de poliploidía en semillas de las orquídeas *L. autumnalis* y *O. tigrinum*. A) Extracción de semilla, B) colchicina grado reactivo, C) orizalina D) tratamientos del primer experimento E y F) Germinación de semilla

Al término de cada ensayo se evaluaron los porcentajes de germinación, supervivencia de protocormos y plántulas, la longitud de plantas, el número de hojas y raíces. En cada fase se utilizaron diseños experimentales completamente al azar con arreglo de tratamientos factorial, con 10 repeticiones, la unidad experimental consistió en un frasco con 20 mg de semilla, y 200 protocormos.

La inducción de poliploidía en los explantes tratados se comprobó por medio de observaciones visuales de las plántulas desarrolladas y conteo de cromosomas.

3.4 Conteo de cromosomas

Para el conteo de cromosomas se tomaron puntas de raíz de las plántulas que presentaron diferencias morfológicas obtenidas de los explantes tratados con las

diferentes dosis y tiempos de agentes antimitóticos, de aproximadamente 1 cm y se colocaron durante 5 horas en una solución con 50 mg de colchicina a 5-6 °C. Las puntas de las raíces se enjuagaron con agua destilada y se transfirieron a solución fijadora e hidrolizada de HCl 1 N: ácido acético glacial (3: 1, v / v) durante 3-4 horas a temperatura ambiente. Las puntas de las raíces se tiñeron con una solución de aceto-orceína al 45% (v / v) durante 1-2 horas, se colocaron en un portaobjetos de vidrio, y se aplastaron. Para observar el número de cromosomas se cuantificó en un microscopio óptico con un aumento de 100 veces con aceite de inmersión (Azmi *et al.*, 2016)

IV. RESULTADOS

De las hibridaciones que se realizaron por polinización manual de 10 flores de plantas de *L. autumnalis* y 10 flores de plantas de *O. tigrinum*, se cosecharon 10 frutos de *L. autumnalis* después de tres meses de su polinización; mientras que de *O. tigrinum*, solo se cosecharon 2 frutos después de 12 meses de su polinización. La prueba de tetrazolio mostró un 100 % de viabilidad para semillas de *L. autumnalis*, y para *O. tigrinum* del 100 % de la semilla, el 26.3 % presentó testas sin embrión, el porcentaje restante (73.7) presentó semillas con embrión de las cuales de las cuales solamente el 75.3 % fueron viables.

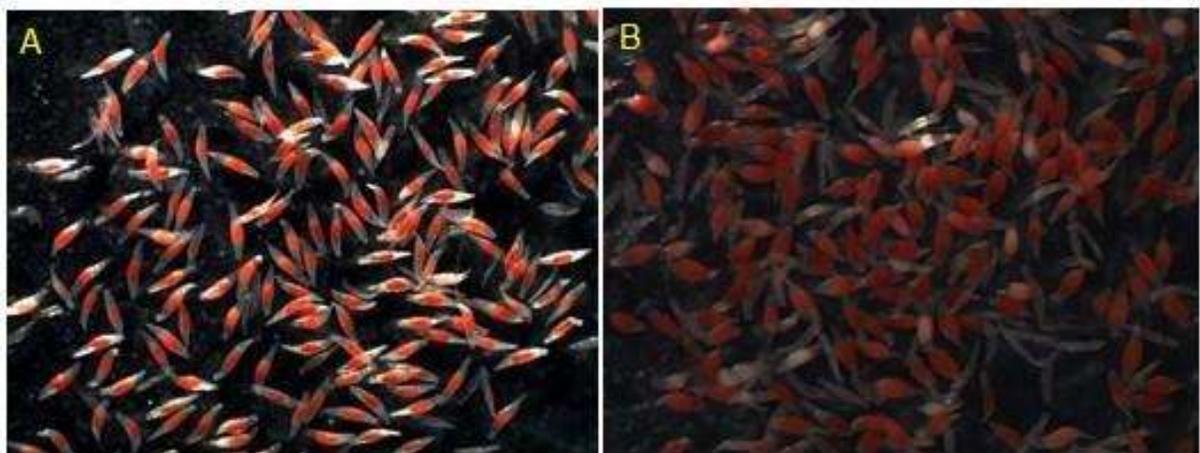


Figura 7. Prueba de tetrazolio de semillas de orquídeas A) *Laelia autumnalis*, B) *Oncidium tigrinum*.

4.1 Desarrollo de plántulas de *Laelia autumnalis* a partir de semillas tratadas con soluciones antimetabólicas

El porcentaje de viabilidad fue altamente significativo, y esto se debió al tipo de solución antimetabólica, a la dosis y al tiempo de exposición, así como a la interacción entre estos factores (Cuadro 3). Aunque la mayor viabilidad (84.5 %) se obtuvo en semillas expuestas

a colchicina al 0.1 % durante dos días, en términos generales esta sustancia redujo la viabilidad de las semillas en comparación con la orizalina. En promedio de todos los tratamientos de cada solución antimicrobiana, las semillas tratadas con colchicina registraron 37.10 % de viabilidad en comparación con 49.14 % de las semillas tratadas con orizalina (Figura 8).

Cuadro 3. Análisis de varianza para el efecto de los factores agente antimicrobiano, dosis y tiempo sobre la viabilidad de semillas de *Laelia autumnalis*.

Fuente de Varianza	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>f
Antimicrobiano	1	3475.34	3475.34	48.8	<.0001
Dosis	3	3921.08	1307.02	18.35	<.0001
Tiempo	3	42988.52	14329.5	201.21	<.0001
Anti*dosis	3	7677.22	2559.07	35.93	<.0001
Anti*tiempo	3	512.18	170.72	2.4	0.0762
Dosis*tiempo	9	12594.06	1399.34	19.65	<.0001
Anti*dosis*tiempo	9	8345.2	927.24	13.02	<.0001

CV: 19.56 R²:0.94

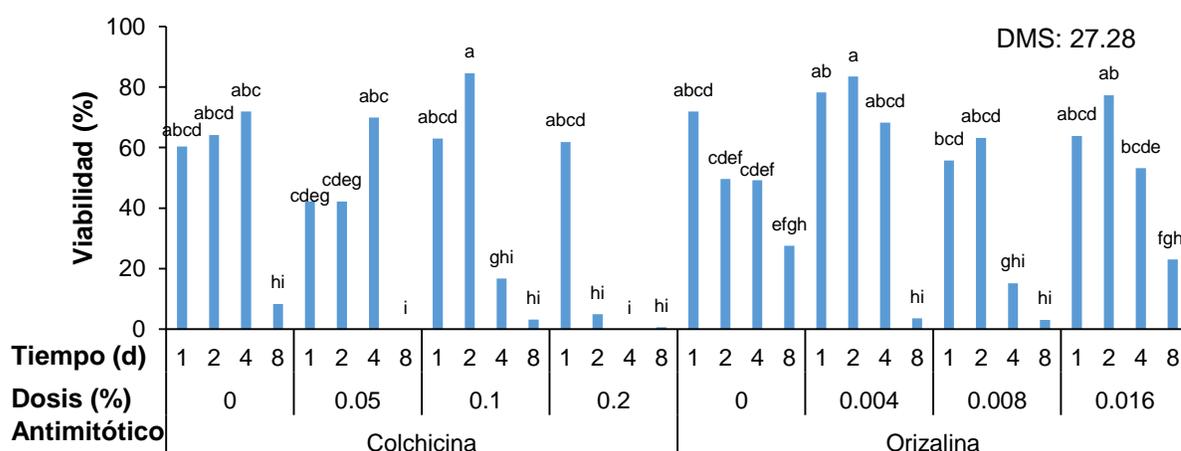


Figura 8. Porcentaje de viabilidad de semillas de *Laelia autumnalis* tratadas con agentes antimicrobianos.

La inmersión de las semillas en las soluciones antimicrobianas durante 4 y 8 días redujo drásticamente la viabilidad de los embriones, en los tratamientos con 0.2 % de colchicina

no se obtuvieron embriones vivos y en el tratamiento 0.2 % de colchicina durante dos días se presentó un 5 % de viabilidad. Además se registró una correlación negativa altamente significativa ($r=-0.71$, $p\leq 0.0001$), que indica que la viabilidad se reduce hasta 71% a medida que se aumenta el tiempo de exposición. Esta tendencia también se observó en el tratamiento sin soluciones antimetabólicas, lo que indica que la inmersión de las semillas en agua destilada estéril también causa un daño en los embriones.

Las semillas no tratadas o con una dosis baja de colchicina u orizalina presentaron mayor viabilidad comparada con aquellas tratadas con las dosis media y alta de ambos agentes antimetabólicos; los resultados de correlación entre las variables dosis y porcentaje de viabilidad indican que la viabilidad se reduce hasta 20% conforme aumenta dosis de agente antimetabólico ($r=-0.20$, $p\leq 0.04$).

El desarrollo de las plántulas obtenidas de las semillas tratadas también se vio afectado por los tratamientos evaluados. La dosis y el tiempo de duración del agente antimetabólico al que fue expuesta la semilla, así como la interacción entre estos, dos factores (Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis de varianza para el efecto de los factores agente antimetabólico, dosis y tiempo sobre la altura de plántulas provenientes de semillas de *Laelia autumnalis*.

Fuente de Varianza	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>f
Antimetabólico	1	28.178	28.178	121.72	<.0001
Dosis	3	30.135	10.045	43.39	<.0001
Tiempo	3	4.154	1.384	5.98	0.0005
Anti*dosis	3	1.503	0.501	2.17	0.0905
Anti*tiempo	3	0.497	0.165	0.72	0.542
Dosis*tiempo	9	5.951	0.661	2.86	0.0025
Anti*dosis*tiempo	9	0.587	0.065	0.28	0.9796
CV: 25.77 R ² :0.23					

La altura de las plántulas se incrementó cuando se utilizaron dosis medias o altas de agentes antimetabólicos (Figura 9); el análisis de correlación indicó una relación positiva ($r=0.23$) altamente significativa ($p \leq 0.0001$) entre las variables dosis y altura, es decir, al incrementar la dosis de cualquier agente antimetabólico la altura de las plantas aumentó hasta en 23 %. Las plántulas de semillas expuestas a dosis medias y altas de antimetabólicos durante un día fueron más altas (4.02 y 3.79 cm) que las plántulas de semillas no tratadas (2.55 cm de altura); mientras que la exposición a soluciones antimetabólicas en concentraciones medias y altas durante cuatro días presentaron plantas de menor tamaño (3.38 y 3.24 % respectivamente).

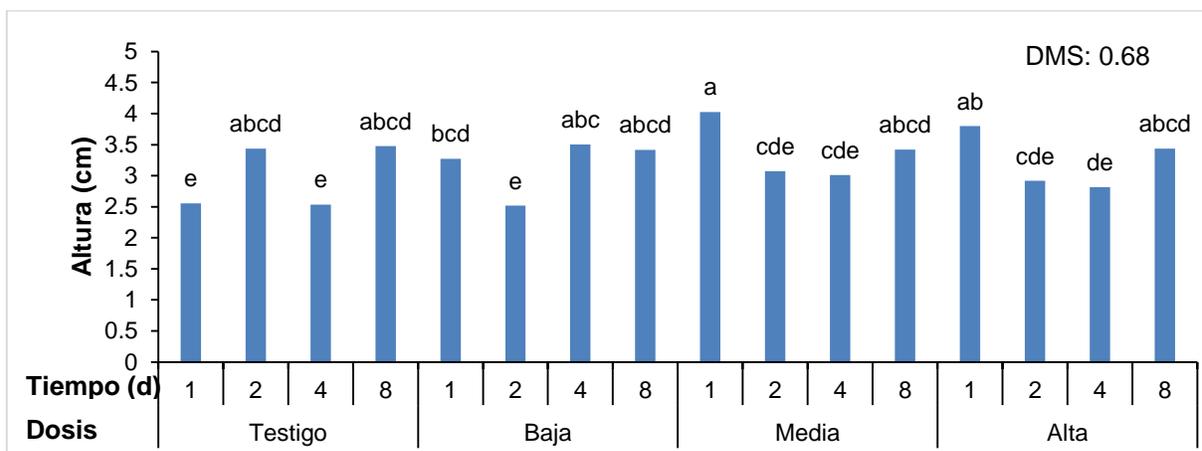


Figura 9. Altura de plántulas provenientes de semillas de *Laelia autumnalis* tratadas con agentes antimetabólicos.

El número de hojas de las plántulas estuvo influenciado, de manera independiente, por el tipo de antimetabólico y el tiempo al que estuvo expuesta la semilla; mientras que las interacciones entre el tipo de antimetabólico y la dosis, y entre la dosis y el tiempo de exposición también influyeron sobre la formación de hojas (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de varianza para el efecto de los factores agente antimetabólico, dosis y tiempo sobre el número de hojas de plántulas provenientes de semillas de *Laelia autumnalis*.

Fuente de Varianza	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>f
Antimetabólico	1	5.309	5.309	6.12	0.0136
Dosis	3	4.053	1.351	1.56	0.1985
Tiempo	3	7.565	2.521	2.91	0.034
Anti*dosis	3	10.512	3.504	4.04	0.0073
Anti*tiempo	3	2.104	0.701	0.81	0.4892
Dosis*tiempo	9	88.625	9.847	11.35	<.0001
Anti*dosis*tiempo	9	13.258	1.473	1.7	0.0858

CV:22.83 R²:0.18

Las plántulas generadas de semillas tratadas con colchicina presentaron en promedio 2.9 % más hojas (4.1 hojas) que las tratadas con orizalina (3.98 hojas); la exposición de las semillas a dosis bajas de soluciones antimetabólicas durante 8 días incrementó el número de hojas por plántula (4.29 hojas) aunque en dosis medias y altas esta variable disminuyó en 26 %, esta reducción en el tamaño de la hoja también se presentó en las dosis medias y altas durante cuatro días las cuales presentaron en promedio 3.9 hojas (Figura 10). Así mismo se puede observar que la interacción de la dosis y el tiempo afectó el número de hojas, ya que se observa una reducción en el número de hojas cuando se utiliza una dosis media o alta durante 4 o 8 días (3.5 y 3.6 hojas respectivamente), comparadas con el número de hojas que presentan las plantas originadas de semillas tratadas con una dosis baja durante 4 o 8 días (4.5 hojas).

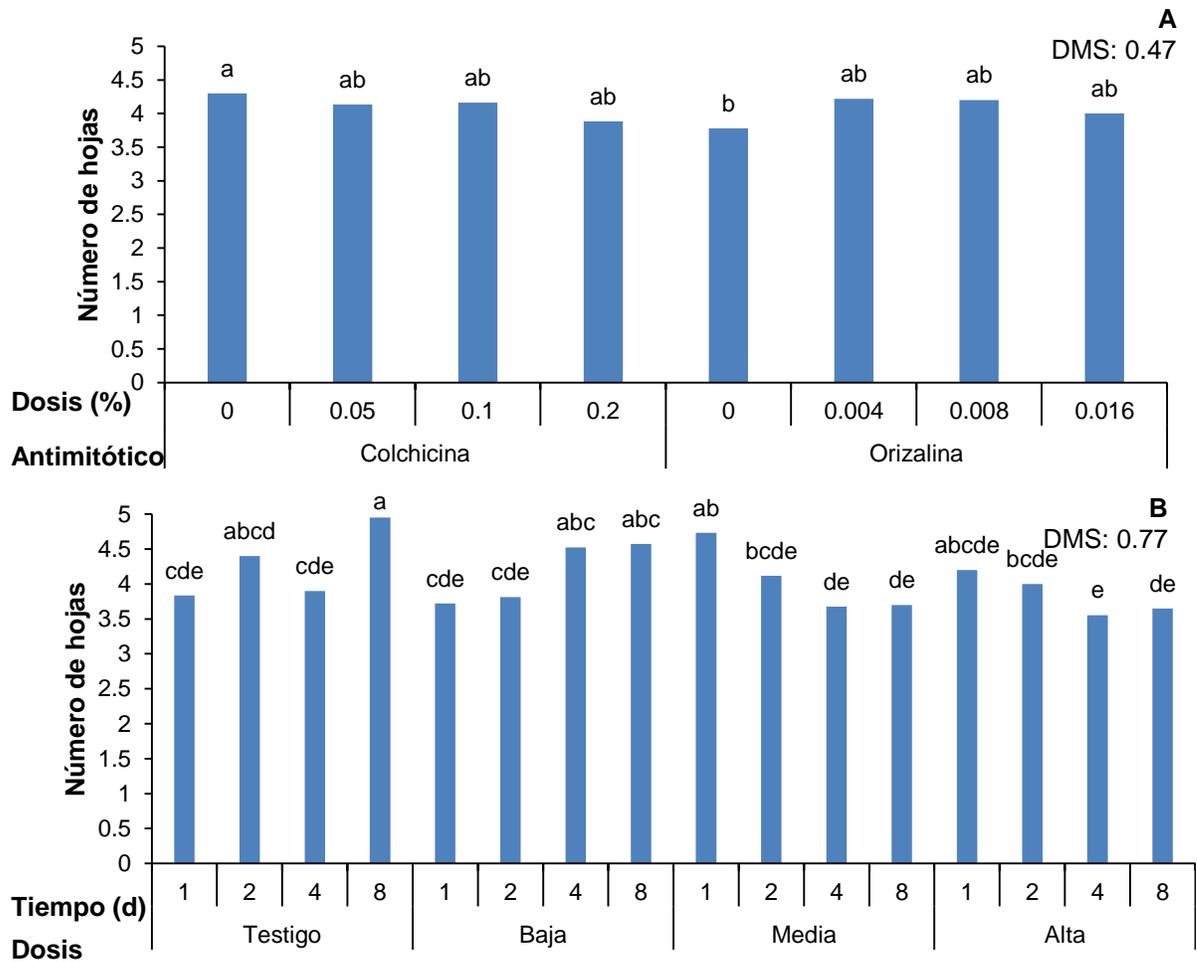


Figura 10. Número de hojas de plantas de *Laelia autumnalis* provenientes de semillas tratadas con agentes antimitóticos. A) Dosis * Agente antimitótico y B) Tiempo * Dosis.

La variable número de raíces estuvo influenciada de manera altamente significativa por la dosis del agente antimitótico y el tiempo de inmersión, y de forma significativa por la interacción entre el tipo de antimitótico y el tiempo de exposición de la semillas, y de forma altamente significativa por la interacción entre las dosis del tiempo de exposición de semillas al agente antimitótico (Cuadro 6). La exposición de semillas a cualquier agente antimitótico en dosis bajas durante 8 días promueve la rizogénesis en las plántulas (4.7 raíces por plántula), este comportamiento similar lo tienen las plantas que provienen de semillas expuestas durante 8 días en agua. También se pudo observar que las

semillas del tratamiento testigo expuestas solo a agua durante 4 días generaron 3.7 raíces, lo cual es estadísticamente igual a las generadas por las plantas provenientes de semillas expuestas durante ocho días a los agentes antimicrobianos (Figura 11); además, el número de raíces estuvo altamente correlacionado ($r= 0.22$, $p\leq 0.0001$) con el tiempo de exposición pues a medida que aumentó el tiempo de exposición el número de raíces se incrementó hasta 22.8 %.

Cuadro 6. Análisis de varianza para el efecto de los factores agente antimicrobiano, dosis y tiempo sobre el número de raíces de plántulas provenientes de semillas de *Laelia autumnalis*.

Fuente de Varianza	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>f
Antimicrobiano (Anti)	1	0.383	0.383	0.58	0.4474
Dosis	3	9.639	3.213	4.84	0.0024
Tiempo	3	37.618	12.539	18.9	<.0001
Anti*dosis	3	4.138	1.379	2.08	0.1016
Anti*tiempo	3	7.21	2.403	3.62	0.0129
Dosis*tiempo	9	52.881	5.875	8.86	<.0001
Anti*dosis*tiempo	9	6.204	0.689	1.04	0.4068

CV:38.91 R²:0.20

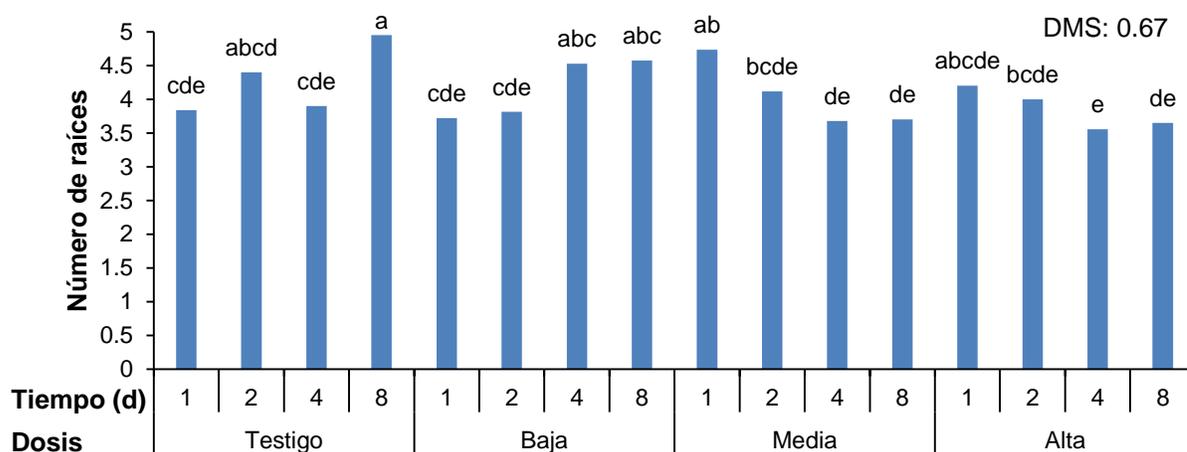


Figura 11. Efecto entre la interacción de los factores tiempo * dosis sobre el número de raíces de plántulas de *Laelia autumnalis* provenientes de semillas

La exposición a la colchicina durante 8 días originó plántulas con mayor número de raíces (2.88 raíces) comparadas con las plántulas del resto de los tratamientos; así mismo las plantas expuestas a colchicina u orizalina durante 1, 2 o 4 días formaron menos raíces, a excepción de las plantas provenientes de semillas expuestas a orizalina durante ocho días que en promedio formaron 2.6 raíces por plántula (Figura 12).

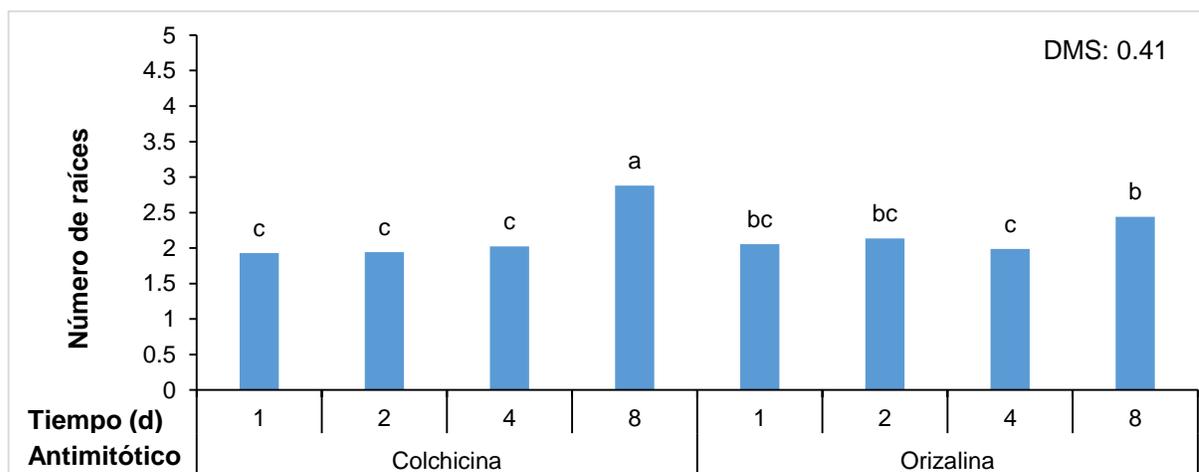


Figura 12. Efecto entre la interacción de los factores tiempo * agente antimitótico sobre el número de raíces de plántulas de *Laelia autumnalis* provenientes de semillas

La longitud de raíces estuvo determinada por la interacción de los tres factores de estudio: tipo y dosis de antimitótico y tiempo de exposición (Cuadro 7). Las plántulas de semillas expuestas a colchicina y orizalina durante 8 días tuvieron raíces más; estos tratamientos fueron similares a las plántulas del tratamiento en donde las semillas se sumergieron en agua durante 2 días, que fue estadísticamente similar a los tratamientos antes mencionados (Figura 13).

Cuadro 7. Análisis de varianza para el efecto de los factores agente antimitótico, dosis y tiempo sobre la longitud de plántulas provenientes de semillas de *Laelia autumnalis*.

Fuente de Varianza	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>f
Antimitótico	1	0.873	0.873	2.28	0.1312
Dosis	3	0.235	0.078	0.2	0.8931
Tiempo	3	25.07	8.356	21.84	<.0001
Anti*dosis	3	3.406	1.135	2.97	0.0313
Anti*tiempo	3	11.144	3.714	9.71	<.0001
Dosis*tiempo	9	44.224	4.913	12.84	<.0001
Anti*dosis*tiempo	9	13.157	1.461	3.82	<.0001

CV:37.33 R²:0.27

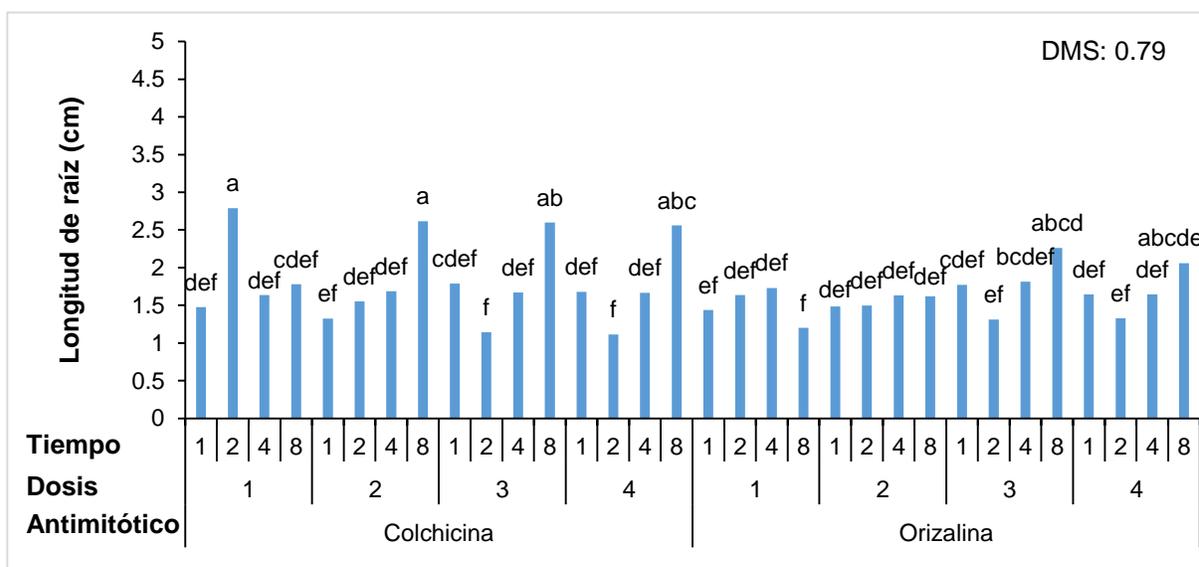


Figura 13. Efecto entre la interacción de los factores tiempo * dosis * agente antimitótico sobre el número de raíces de plántulas de *Laelia autumnalis* provenientes de semillas

4.2 Desarrollo de plántulas de *Laelia autumnalis* a partir de protocormos tratados con soluciones antimetabólicas

La supervivencia de los protocormos, sólo se vio afectada por la dosis y el tiempo de exposición independientemente del tipo de agente antimetabólico usado (Cuadro 8). En la Figura 14A, se puede observar que a medida que aumentó la dosis del antimetabólico disminuyó la supervivencia de estas estructuras celulares; el factor tiempo de inmersión también redujo la supervivencia, los protocormos expuestos durante 8 días a agentes antimetabólicos fueron los que menos sobrevivieron (61.3 %), esto comparado con los protocormos expuestos durante uno, dos y cuatro días (73.49, 68.69 y 72% de supervivencia, respectivamente).

Cuadro 8. Análisis de varianza para el efecto de los factores agente antimetabólico, dosis y tiempo sobre la supervivencia de protocormos de *Laelia autumnalis*.

Fuente de Varianza	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>f
Antimetabólico	1	146.07	146.07	3.55	0.0630
Dosis	3	9655.46	3218.48	78.17	<.0001
Tiempo	3	2440.31	813.43	19.76	<.0001
Anti*dosis	3	247.59	82.53	2.00	0.1194
Anti*tiempo	3	186.88	62.29	1.51	0.2169
Dosis*tiempo	9	908.50	100.94	2.45	0.0155
Anti*dosis*tiempo	9	152.57	16.95	0.41	0.9257

CV:9.28 R²:0.79

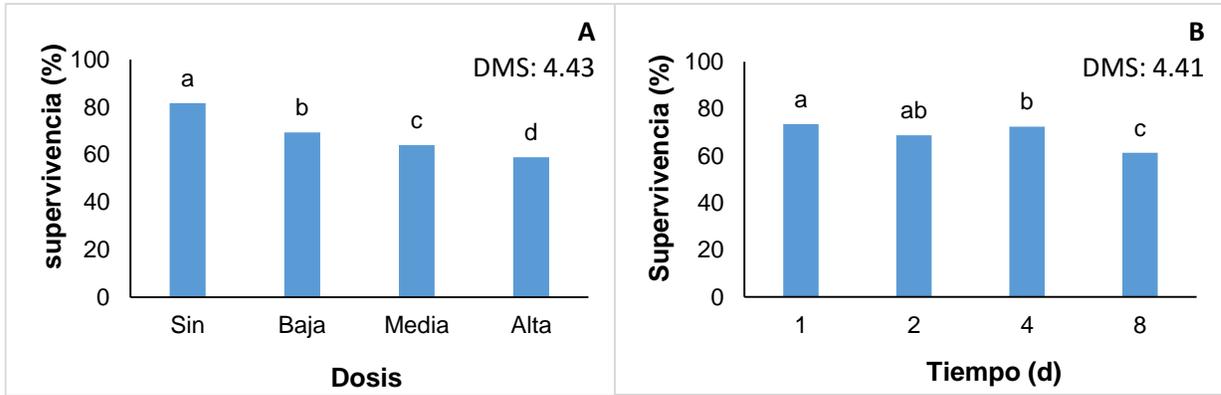


Figura 14. Supervivencia de protocormos de *Laelia autumnalis* tratados con agentes antimetabólicos.

Los tratamientos aplicados a los protocormos influyeron sobre el desarrollo de las plántulas regeneradas *in vitro*. La altura de las plántulas fue altamente afectada por los factores tipo de antimetabólico, dosis y tiempo de inmersión, de manera independiente y por la dosis y el tiempo de manera combinada (Cuadro 9).

Cuadro 9. Análisis de varianza para el efecto de los factores agente antimetabólico, dosis y tiempo sobre la altura de plántulas provenientes de protocormos de *Laelia autumnalis*.

Fuente de Varianza	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>f
Antimetabólico (Anti)	1	28.178	28.178	121.72	<.0001
Dosis	3	30.135	10.045	43.39	<.0001
Tiempo	3	4.154	1.384	5.98	0.0005
Anti*dosis	3	1.503	0.501	2.17	0.0905
Anti*tiempo	3	0.497	0.165	0.72	0.5420
Dosis*tiempo	9	5.951	0.661	2.86	0.0025
Anti*dosis*tiempo	9	0.587	0.065	0.28	0.9796

CV:25.77 R²:0.23

Al utilizar orizalina se obtuvieron plantas más altas (2.03 cm) que con colchicina (1.7 cm de altura); es decir con colchicina las plántulas redujeron su altura en 14 % (Figura 15). Las dosis utilizadas, así como el tiempo de exposición de los protocormos a estas soluciones antimetabólicas también afectaron la altura de la planta ya que conforme aumentaron las dosis la altura disminuyó hasta 30 %, y conforme aumenta el tiempo la altura disminuyó en 70 %. Ya que existe una correlación negativa altamente significativa para el factor dosis y significativa para el factor tiempo, pues a medida que aumenta la dosis de las sustancias antimetabólicas y el tiempo de exposición se reduce la altura de la planta en 30 % y 7% respectivamente.

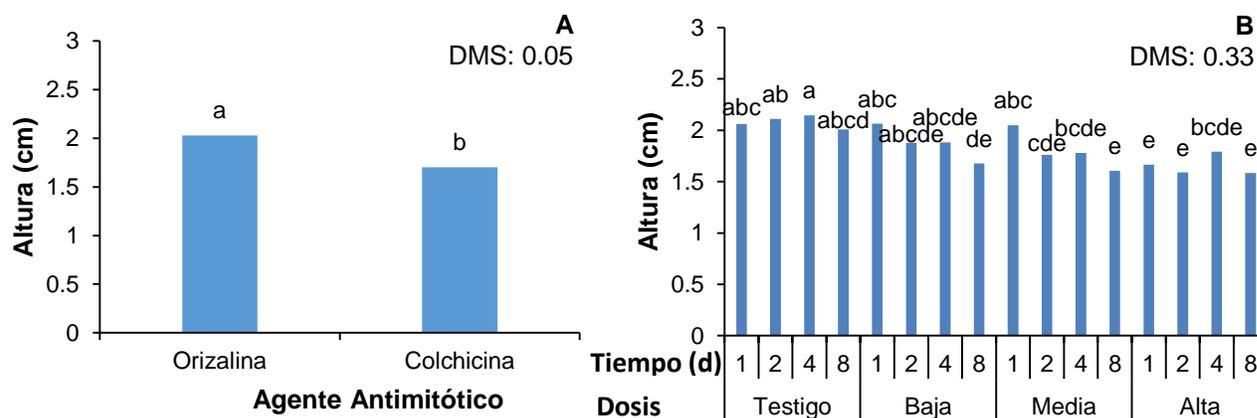


Figura 15. Altura de plántulas de *Laelia autumnalis* provenientes de protocormos tratados con agentes antimetabólicos.

El número de hojas se vio afectado de manera independiente y altamente significativa por el tipo de agente antimetabólico, la dosis y el tiempo de inmersión; de manera combinada el tipo de antimetabólico y su dosis también modificó esta variable respuesta (Cuadro 10). En la Figura 16 se puede observar que a mayor dosis del agente antimetabólico el número de hojas disminuyó hasta 22 %, y este efecto es superior cuando se utilizó orizalina; las plántulas obtenidas de protocormos tratados con solución antimetabólica durante 1, 2 ó 4

días presentaron número de hojas estadísticamente similar, mientras que la exposición durante 8 días disminuyó en 0.19 % la formación de hojas.

Cuadro 10. Análisis de varianza para el efecto de los factores agente antimotómico, dosis y tiempo sobre el número de hojas de plántulas provenientes de protocormos de *Laelia autumnalis*.

Fuente de Varianza	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>f
Antimotómico	1	85.227	85.227	102.87	<.0001
Dosis	3	59.464	19.821	23.93	<.0001
Tiempo	3	8.996	2.998	3.62	0.0128
Anti*dosis	3	7.511	2.503	3.02	0.0289
Anti*tiempo	3	5.227	1.742	2.1	0.0982
Dosis*tiempo	9	13.411	1.49	1.8	0.0645
Anti*dosis*tiempo	9	3.635	0.403	0.49	0.8836

CV:25.90 R²:0.17

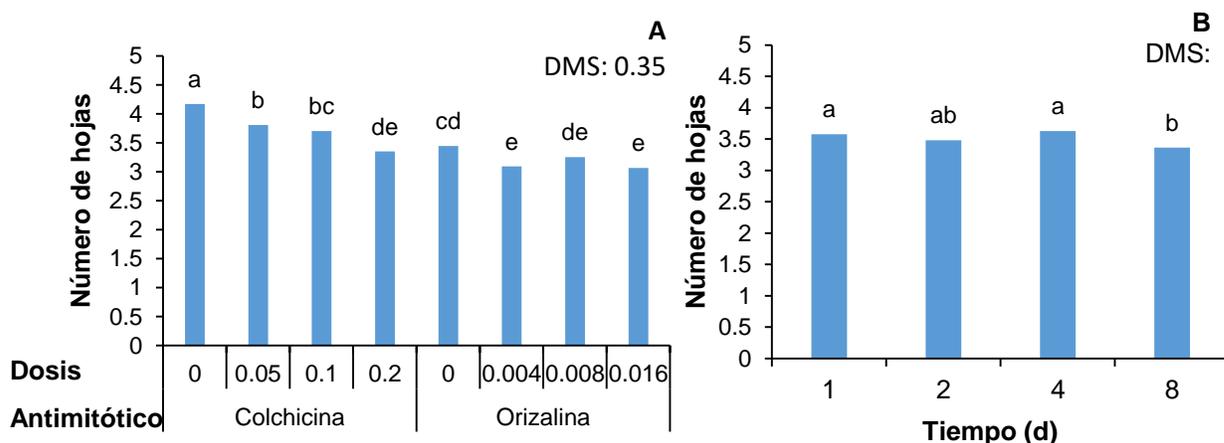


Figura 16. Número de hojas en plantas de *Laelia autumnalis* provenientes de protocormos tratados con soluciones antimotómicas. a) Interacción antimotómico x dosis, b) tiempo de exposición.

La formación de raíces y su longitud estuvieron determinadas de manera independiente por los factores tipo de antimotómico, dosis y tiempo de exposición, y por la interacción entre el tipo de antimotómico y la dosis y por la dosis y el tiempo de exposición (Cuadro 11). Conforme aumentó la dosis de colchicina u orizalina, se redujo el número de raíces

hasta en 49 % (Figura 17A); se encontró correlación negativa ($r = -0.49$) altamente significativa ($p \leq 0.0001$) entre la dosis y el número de raíces; mientras que los resultados mostraron que independientemente del agente antimetabólico un incremento en los días de exposición y en la dosis disminuye el número de raíces, pues las plantas expuestas 8 días a cualquier dosis produjeron menos raíces que las expuestas solo un día.

Cuadro 11. Análisis de varianza para el efecto de los factores agente antimetabólico, dosis y tiempo sobre el número de raíces de plántulas provenientes de protocormos de *Laelia autumnalis*.

Fuente de Varianza	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>f
Antimetabólico	1	10.44	10.44	14.32	0.0002
Dosis	3	277.024	92.341	126.63	<.0001
Tiempo	3	28.626	9.542	13.09	<.0001
Anti*dosis	3	8.918	2.972	4.08	0.0068
Anti*tiempo	3	1.319	0.439	0.6	0.613
Dosis*tiempo	9	14.374	1.597	2.19	0.0206
Anti*dosis*tiempo	9	1.531	0.17	0.23	0.9897

CV:51.09 R²:0.31

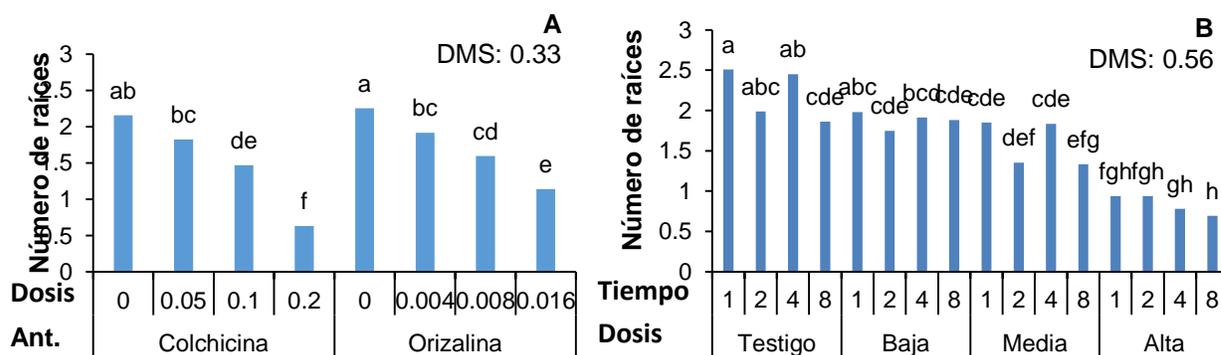


Figura 17. Número de raíces en plantas de *Laelia autumnalis* provenientes de protocormos tratados con soluciones antimetabólicas. a) Interacción antimetabólico x dosis, b) dosis x tiempo

La longitud de la raíces también se vio afectada por la interacción del tipo de antimetabólico con la dosis utilizada (cuadro 12), ya que se puede observar que se presentaron raíces

más largas en las dosis baja, media y alta de orizalina (1.16, 1.08, 0.55 cm respectivamente), comparadas con las dosis baja, media y alta de colchicina (0.96, 0.93, 0.29 cm respectivamente), la interacción de las dosis utilizadas con el tiempo de exposición de protocormos a agentes antimitóticos, influye en la longitud de la raíz, pues las raíces más pequeñas se encontraron en las dosis altas y esta longitud se redujo conforme aumentó el tiempo de exposición (Figura 18).

Cuadro 12. Análisis de varianza para el efecto de los factores agente antimitótico, dosis y tiempo sobre la longitud de raíces de plántulas provenientes de protocormos de *Laelia autumnalis*.

Fuente de Varianza	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>f
Antimitótico	1	6.228	6.228	30.03	<.0001
Dosis	3	157.447	52.482	253.04	<.0001
Tiempo	3	11.919	3.973	19.16	<.0001
Anti*dosis	3	2.3	0.766	3.70	0.0115
Anti*tiempo	3	0.616	0.205	0.99	0.3962
Dosis*tiempo	9	5.92	0.657	3.17	0.0009
Anti*dosis*tiempo	9	0.345	0.038	0.18	0.9957
CV:44.69 R ² :0.46					

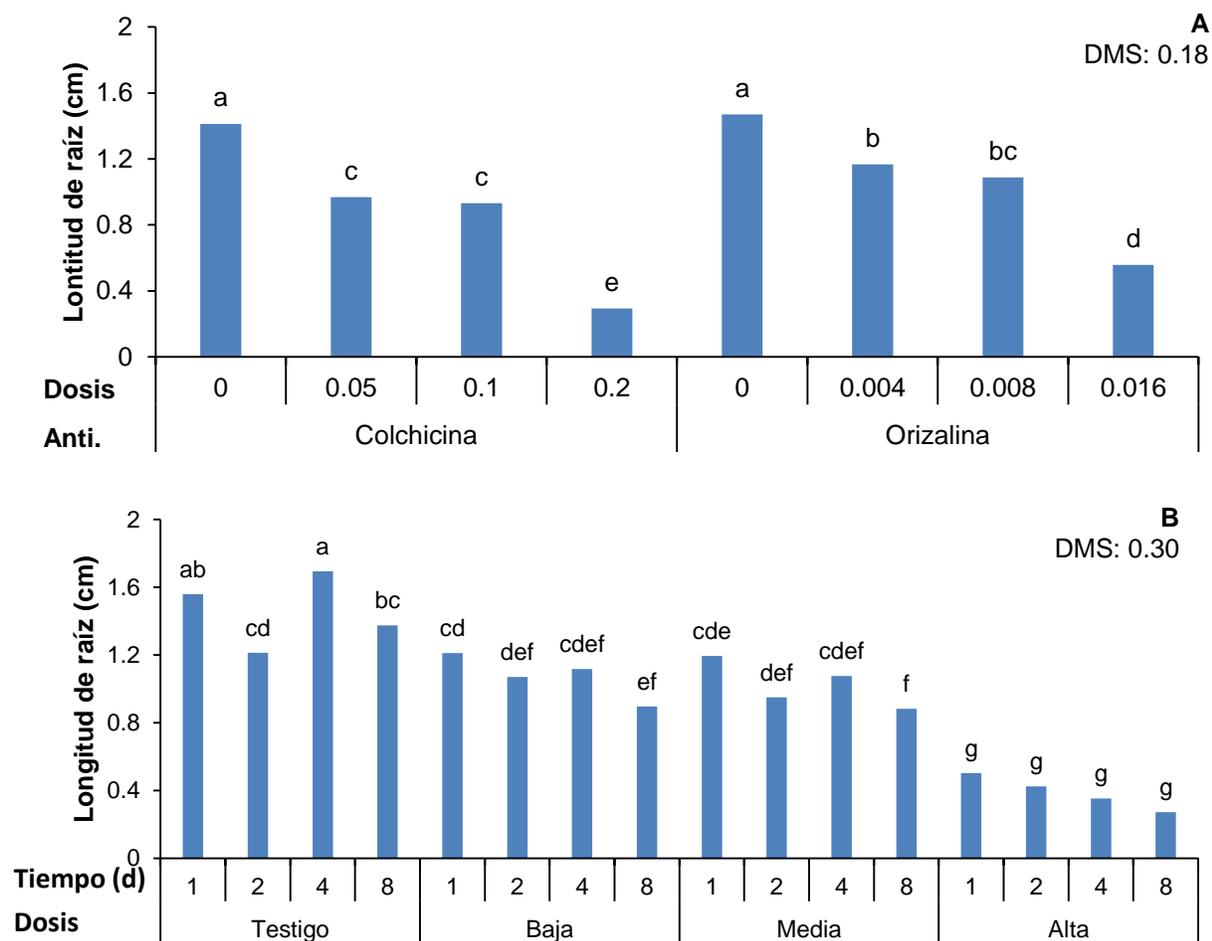


Figura 18. Longitud de raíces en plantas de *Laelia autumnalis* provenientes de protocormos tratados con soluciones antimicrobicas. a) Interacción antimicrobico x dosis, b) dosis x tiempo

4.3 Desarrollo de plántulas de *Oncidium tigrinum* a partir de protocormos tratados con soluciones antimicrobicas

El porcentaje de viabilidad de semillas de *O. tigrinum* tratadas con colchicina y orizalina fue muy bajo, pues esta variable estuvo determinada por la interacción de los tres factores en estudio (Cuadro 13). En la Figura 19, se observa que las semillas tratadas con colchicina presentaron menor viabilidad que con orizalina; además, para ambos agentes

antimitóticos el tiempo fue determinante, debido a que a medida que aumentó el tiempo de exposición de la solución antimitótica se redujo la viabilidad hasta en 39 %, cuando las semillas se trataron durante 8 días en las soluciones se presentaron los porcentajes de viabilidad más bajos o bien, la totalidad de los embriones murieron, como ocurrió en los tratamientos expuestos solamente a agua durante 8 días, así como los expuestos a dosis de 0.05 % de colchicina durante 4 días, también las expuestas a 0.1 % de colchicina durante 8 días, lo mismo ocurrió cuando las semillas fueron expuestas a dosis de 0.2 % de colchicina durante 4 y 8 días.

Cuadro 13. Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto de los agentes antimitóticos sobre la viabilidad de semillas de *Oncidium tigrinum*.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Viabilidad de las semillas (%)
Antimitótico	1	184.03**
Dosis	3	2.63 ^{ns}
Tiempo	3	51.02**
Anti*dosis	3	3.05 ^{ns}
Anti*tiempo	3	3.15 ^{ns}
Dosis*tiempo	9	184.23**
Anti*dosis*tiempo	9	10.35**

no significativo (^{ns}), significativo (*) y altamente significativo (**) $P \leq 0.05$

En el resto de las semillas que sobrevivieron, el embrión emergió de la testa e inició la formación de protocormos; sin embargo, éstos se tornaron de color café oscuro y finalmente se necrosaron sin llegar a la formación de plántulas en ninguno de los tratamientos tratados.

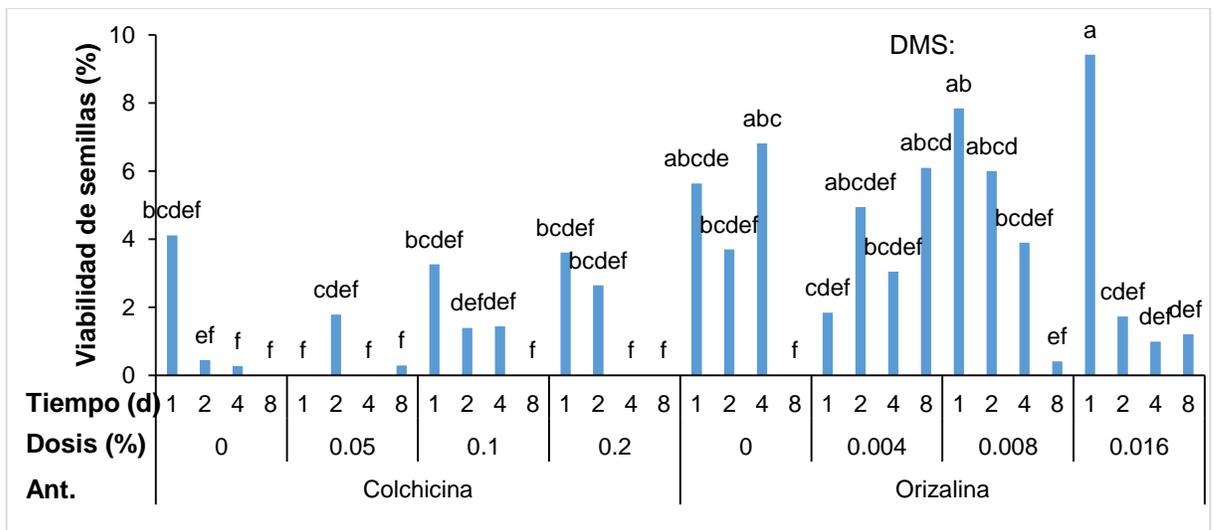


Figura 19. Viabilidad de semillas de *Oncidium tigrinum* tratadas con colchicina y orizalina.

4.4 Desarrollo de plántulas de *Oncidium tigrinum* a partir de protocormos tratados con soluciones antimitóticas

La interacción de los tres factores de estudio, tipo de antimitótico, concentración y tiempo de exposición afectó el desarrollo de los protocormos de *O. tigrinum*; las plántulas obtenidas presentaron diferencias estadísticas significativas y altamente significativas para las variables altura debido a los tres factores de estudio y las interacciones entre estos; el número de hojas no se vio afectado por el tiempo de exposición de manera independiente, ni en interacción con la dosis de los agentes antimitóticos, pero si se vio afectado por las interacción de los tres factores y número de hojas respectivamente (Cuadro 14).

Cuadro 14. Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto de la colchicina y orizalina sobre la altura y número de hojas de plántulas de *Oncidium tigrinum*.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Altura de plántulas	Número de hojas
Antimitótico	1	16.24**	12.92**
Dosis	3	12.35**	15.05**
Tiempo	3	0.29**	0.27 ^{ns}
Anti*dosis	3	4.58**	6.05**
Anti*tiempo	3	0.13**	0.46*
Dosis*tiempo	9	0.21**	0.25 ^{ns}
Anti*dosis*tiempo	9	0.07*	0.40**

no significativo (^{ns}), significativo (*) y altamente significativo (**) $P \leq 0.05$

La altura de las plantas y el número de hojas disminuyeron cuando los protocormos se trataron con las soluciones antimitóticas, más con la colchicina que con la orizalina; en promedio de todos los tratamientos, la altura de las plantas fue de 0.56 cm y 0.95 cm para las plantas tratadas con colchicina y orizalina, respectivamente. Se encontraron correlaciones negativas altamente significativas entre la dosis empleadas y la altura de las plantas ($r=-0.61$ $p \leq .0001$) y entre la dosis y el número de hojas ($r=-0.48$ $p \leq .0001$) lo que significa que conforme se incrementa la dosis de la solución antimitótica se redujo la altura de las plantas en 0.92 % y el número de hojas en 1.45 %. Con dosis medias y altas de colchicina durante 2 a 8 horas los protocormos se necrosaron y no se logró la regeneración de plántulas. Con respecto al tiempo de exposición se pudo observar que cuando se utiliza la colchicina como agente antimitótico a mayor tiempo de exposición se presentan plantas más pequeñas, esta tendencia también se presentó con la orizalina, aunque fue menos marcada que con colchicina (Figura 20).

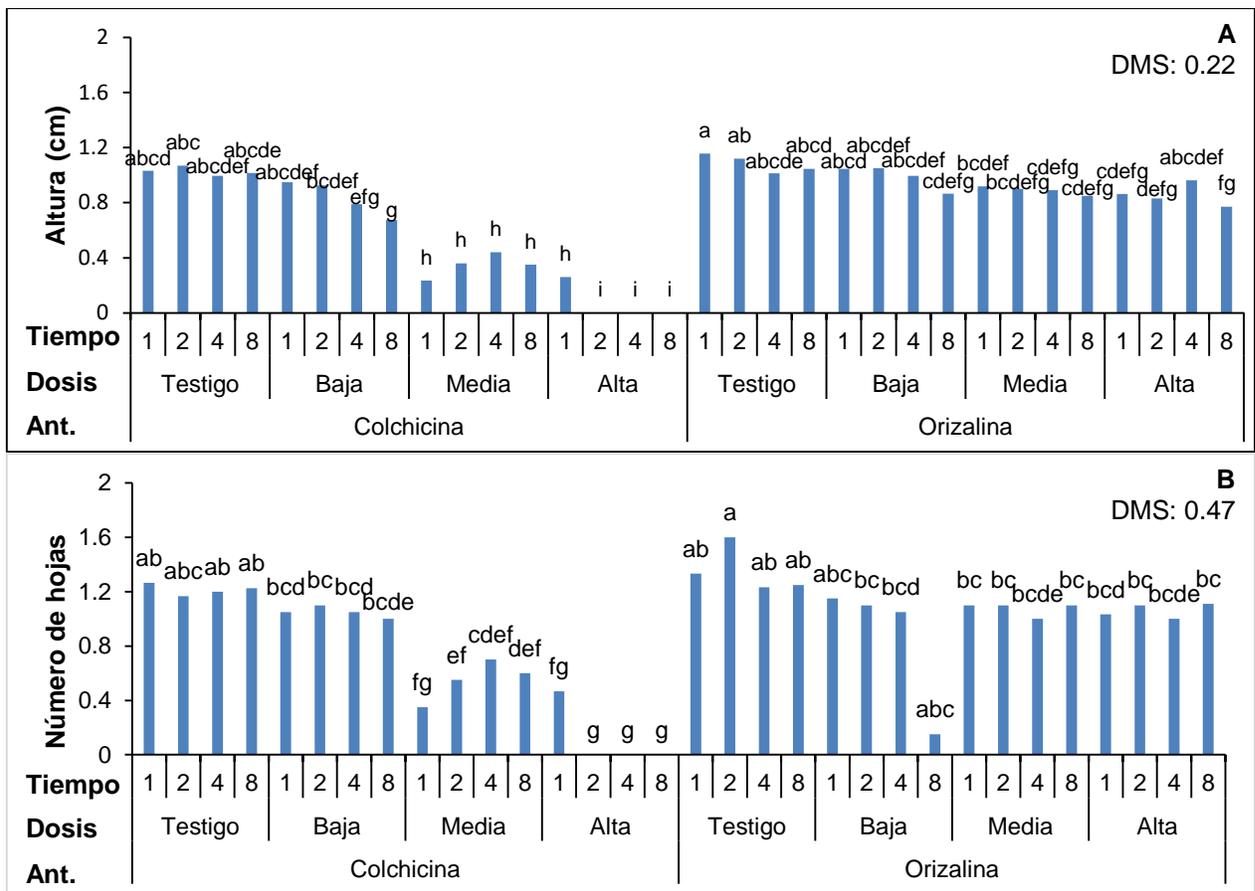


Figura 20. Efecto entre la interacción de los factores tiempo * dosis * agente antimetabólico sobre plántulas de *O. tigrinum* provenientes de protocormos. A) altura y B) número de hojas

El número y longitud de raíces estuvo afectada por el tipo de solución antimetabólica, la concentración utilizada, así como el tiempo de exposición de los protocormos, de manera independiente; excepto en la variable longitud de raíces en donde también se observó un efecto por la interacción entre la dosis y el tiempo de exposición (Cuadro 15).

Cuadro 15. Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto de la colchicina y orizalina sobre el número y longitud de raíces de plántulas de *Oncidium tigrinum*.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Número de raíces	Longitud de raíces
Antimitótico	1	40.55**	0.95**
Dosis	3	0.86**	0.11**
Tiempo	3	0.84**	0.11**
Anti*dosis	3	0.16 ^{ns}	0.00 ^{ns}
Anti*tiempo	3	0.04 ^{ns}	0.00 ^{ns}
Dosis*tiempo	9	0.22 ^{ns}	0.03*
Anti*dosis*tiempo	9	0.19 ^{ns}	0.01 ^{ns}

no significativo (^{ns}), significativo (*) y altamente significativo (**) $P \leq 0.05$

En la Figura 21, se muestra que cuando los protocormos son tratados con colchicina las plántulas desarrollan 0.2 raíces, comparado con los protocormos tratados con orizalina que regeneraron plántulas en el triple de raíces; cuando aumentaron la dosis y el tiempo de exposición, el número de raíces se redujo 8 % y 11 %. Además, el número de raíces está altamente correlacionado de manera positiva con la altura de la planta y el número de pues cuando estas variables aumentan el número de raíces aumenta 42 % y 33 %, respectivamente.

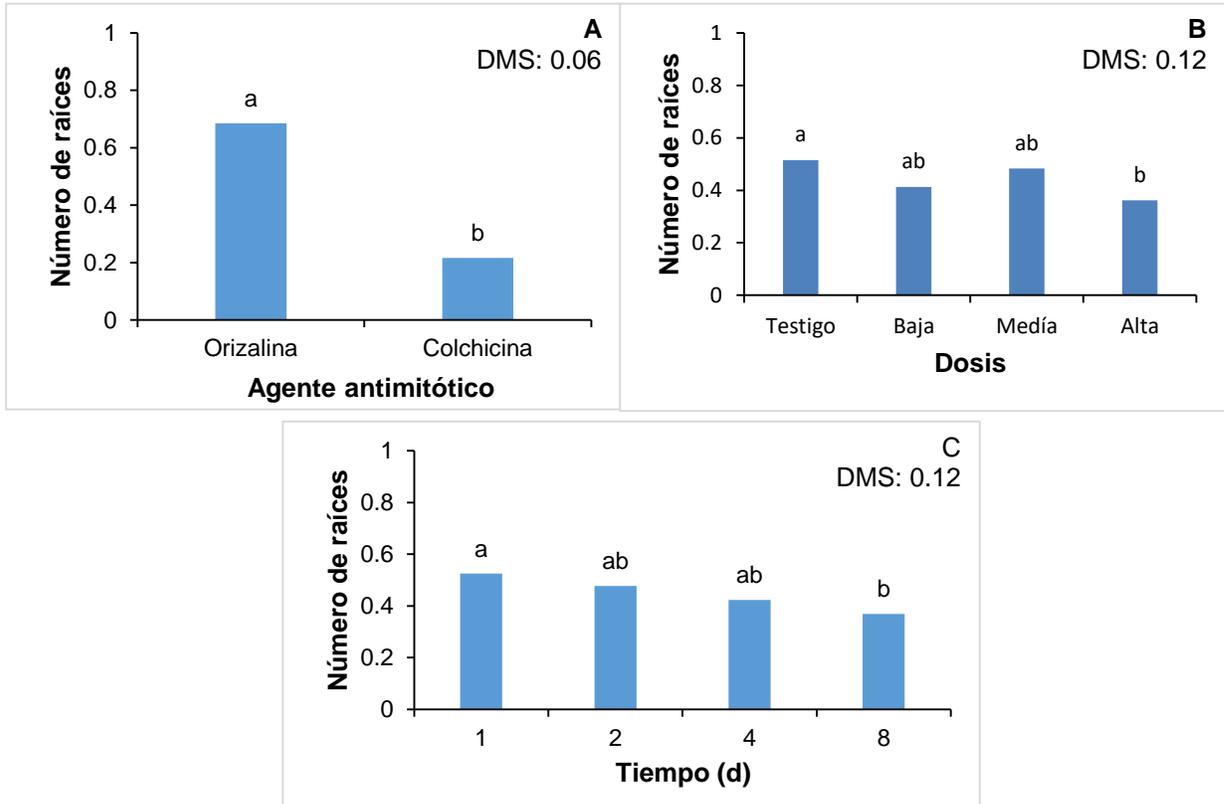


Figura 201. Número de raíces de plántulas de *Oncidium tigrinum* tratadas con colchicina y orizalina. a) agente antimitótico, b) dosis y c) tiempo.

Las plántulas de los protocormos tratados con colchicina presentaron una longitud de raíz menor que los tratados con orizalina, las dosis altas y los tiempos largos de exposición de ambos agentes antimitóticos también afectan la longitud de raíz ya que se redujo la longitud de raíz hasta 14 %, y 15 % respectivamente.

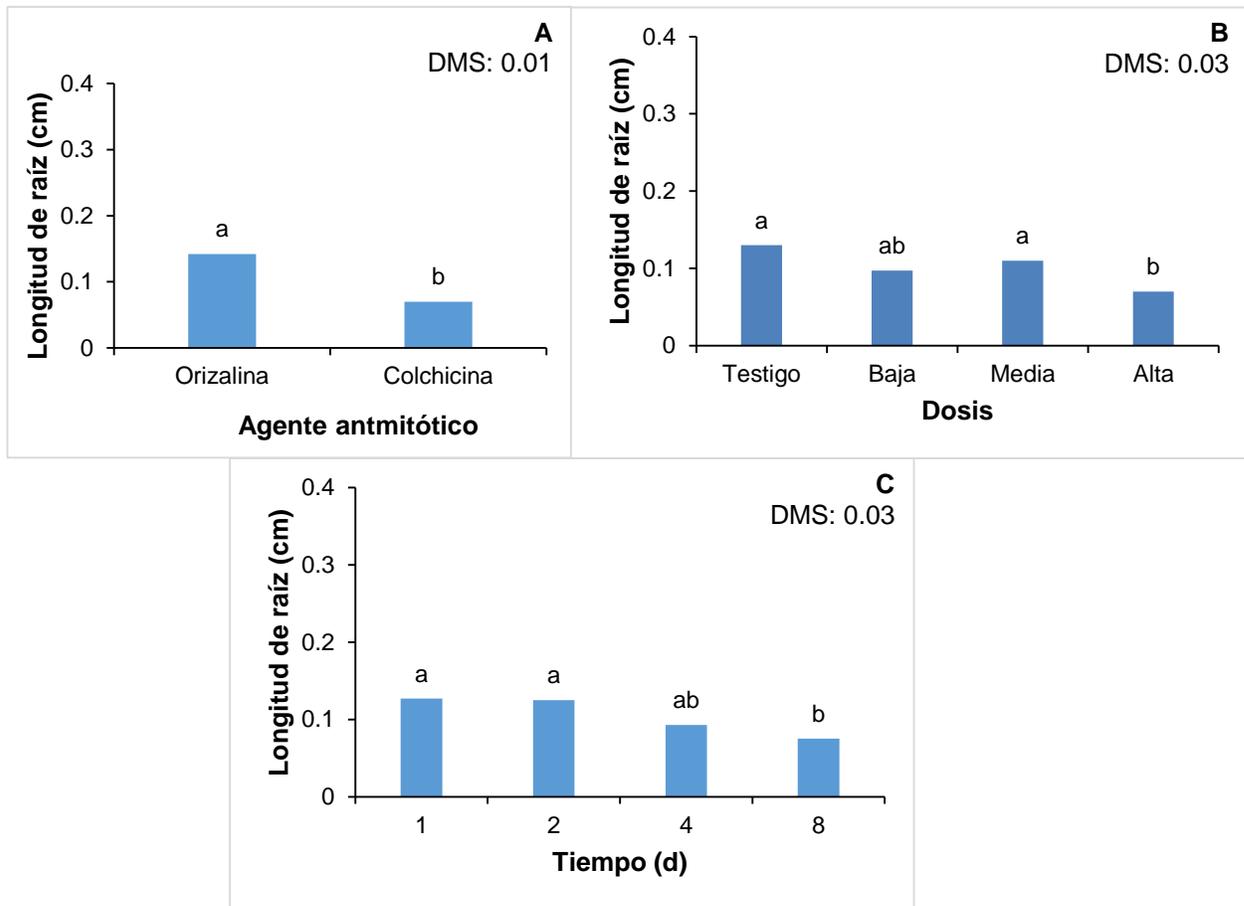


Figura 212 Longitud de raíz de plántulas de *Oncidium tigrinum* tratadas con colchicina y orizalina. a) agente antimitótico, b) dosis y c) tiempo.

4.5 Resultados del Número cromosómico

De la observación de células somáticas en metafase, se determinó que el número cromosómico *L. autumnalis* es $2n = 54$ (Figura 23), en el caso de la orquídea *O. tigrinum*, fue muy difícil encontrar células somáticas en metafase, debido a que tienen capas más lignificadas. Por esto es necesario generar los protocolos para el conteo de cromosomas de la especie *O. tigrinum*.

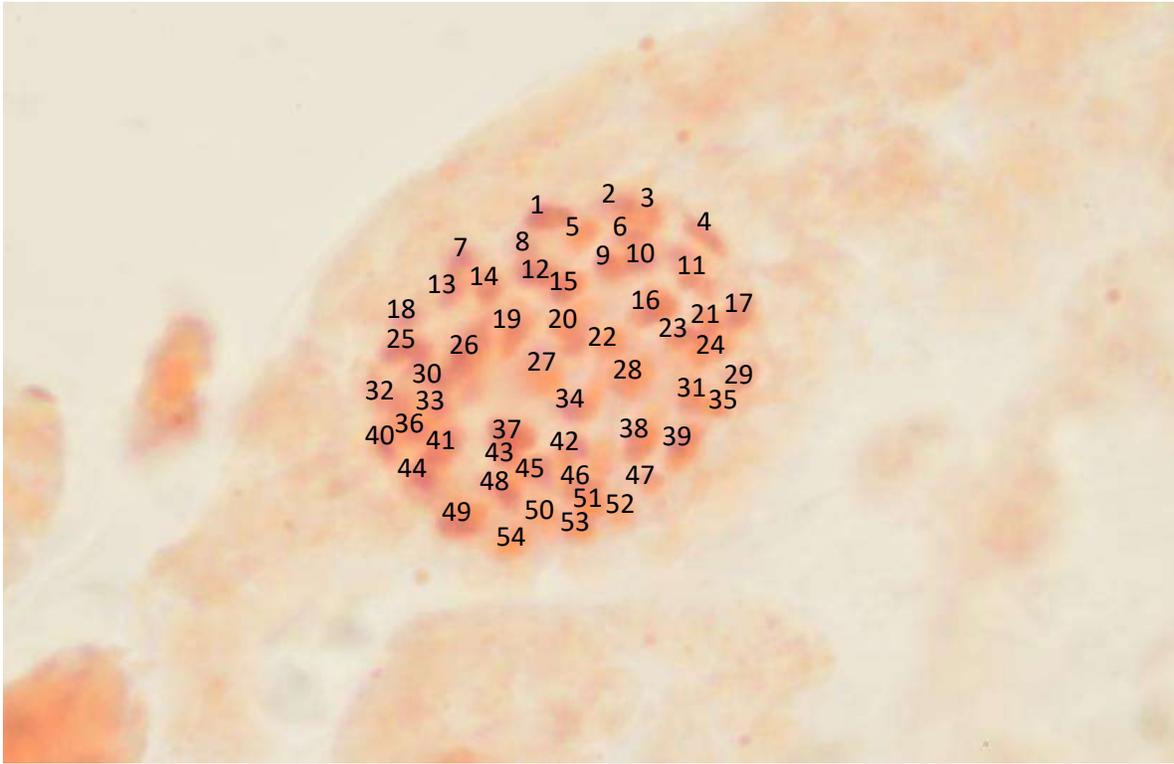


Figura 223. Conteo de cromosomas de *Laelia autumnalis*

Se lograron identificar tres plántulas desarrolladas de protocormos tratados con 0.1 % del agente antimitótico colchicina expuestas a un día a la solución antimitótica con características morfológicas distintivas: hojas más anchas y gruesas, raíces más gruesas.

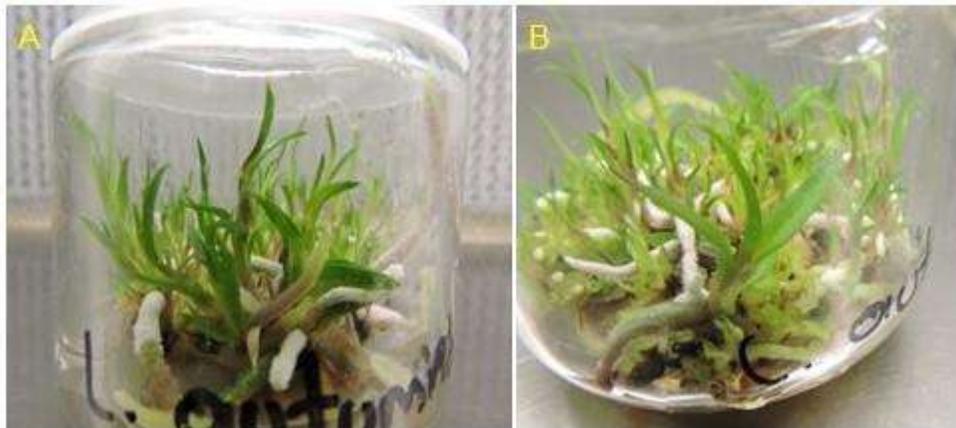


Figura 234. Plantas potencialmente poliploides de *Laelia autumnalis*

V. DISCUSION

La viabilidad de semillas de *L. autumnalis* y *O. tigrinum*, se redujeron conforme se aumentó el tiempo de exposición y la dosis. De los tratamientos evaluados se debe considerar el tamaño pequeño de las semillas y sus estructuras aparentemente simples, pues los integumentos internos y externos pueden engrosarse con lignina o celulosa o contener sustancias cerosas que hacen que la semilla sea impermeable (Barsberg et al., 2013), estas características de la testa de la semilla puede influir en la penetración del tetrazolio e influir en la reducción de la viabilidad (Custodio et al., 2016), en vainilla la prueba de tetrazolio no determinó la viabilidad de la semilla esto debido a que la testa es demasiado oscura para permitir la observación de los embriones teñidos (Alomia et al., 2017).

Para la variable altura de plantas originadas de semillas de *L. autumnalis* tratadas con colchicina y orizalina los tratamientos mostraron un aumento en la altura al ser expuestas a dosis medias de ambos agentes antimitóticos, estos resultados concuerdan con lo encontrado en plantas de *Aloe vera* y *Trachyspermum ammi*, que al utilizar una concentración de 0.1 % de colchicina se encuentran aumentos significativos en la altura de las plantas (Matos, 2014, Sadat et al., 2017). En el caso de las semillas de *O. tigrinum* no desarrollaron plantas esto debido a la baja viabilidad que presentaron las semillas al ser tratadas con agentes antimitóticos

En el caso del número de hojas de plántulas obtenidas de semillas tratadas, hubo una reducción del número de hojas conforme se aumentó la concentración de los agentes antimitóticos, así como el tiempo de exposición de estos, resultados similares se encontraron en *Gladiolus grandiflorus* "White prosperity" por Manzoor et al. (2018), con

el agente antimutagénico se reduce o tiene un efecto inhibitorio sobre la producción de hojas en comparación con el testigo, mientras que las dosis bajas de colchicina aumentan el número de hojas, lo que concuerda con lo reportado en *Kalenchoe daigremontiana* con una dosis de 0.02 % de colchicina aumentó el número de hojas (Salazar *et al.*, 2018). Esto demuestra que la colchicina utilizada a dosis muy bajas puede favorecer el incremento en el número de hojas, mientras conforme se va aumentando la dosis o el tiempo de exposición al agente antimutagénico se reduce el número. Para las variables número y longitud de raíces, los agentes antimutagénicos, así como las concentraciones de éstos y el tiempo de exposición de las semillas a estas soluciones afectó de manera significativa el número de raíces así como la longitud de éstas, pues a medida de que se aumentó la concentración y el tiempo de exposición de los agentes antimutagénicos se presentó menor número de raíces y de longitud más corta. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Gantait *et al.* (2011), que al utilizar 0.1 % de colchicina durante 8 horas, obtuvo individuos tetraploides de *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella, los cuales presentaban menor número de raíces de corta longitud y con una coloración más oscura y con un crecimiento más lento que las de las plantas diploides, y estas características fenotípicas se vuelven útiles para la selección de plantas potencialmente poliploides.

Para los protocormos de *Laelia autumnalis* y *Oncidium tigrinum*, tratados con distintas concentraciones y tiempos de dos agentes antimutagénicos, la supervivencia solo se vio afectada por la dosis y el tiempo de exposición, pues a medida que se incrementa las dosis de los agentes antimutagénicos disminuye la supervivencia, estos resultados concuerdan con los obtenidos con Atichart y Bunnang (2007) y Sarathum *et al.*, (2010) en *Dendrobium secundum* y *Dendrobium scabrilingue* respectivamente, pues las concentraciones altas y el tiempo de exposición más largo de colchicina disminuyeron las

tasas de supervivencia de los protocormos, Sarathum *et al.*, reporta que concentraciones de 0.1 a 1 % son concentraciones muy tóxicas para los protocormos con una tasa superior al 60 %, para el caso de la sustancia antimitótica orizalina, Tilden y Kenneth (2011), reportan que a mayor concentración y duraciones más largas, los explantes presentan menor tasa de supervivencia en protocormos de *Epidendrum*, *Odontioda* y *Phalaenopsis*, esto demuestra que el nivel de resistencia de un protocormo depende de la concentración de la dosis utilizada y el tiempo de exposición.

La altura de plantas de *L. autumnalis* y *O. tigrinum* originadas de protocormos expuestos a distintas dosis y tiempos de exposición en colchicina y orizalina, presentaron una reducción en su tamaño y se vieron afectados por los tres factores, esto comparada con las plantas obtenidas por semilla las cuales presentaron una altura mayor, esto se debe a que los protocormos se forman una vez que la semilla de orquídea ha germinado, este pequeño cuerpo de células es parecido a los callos de tejidos propagados *in vitro* y tienen el potencial de convertirse en una planta (Paek *et al.*, 2011), los distintos factores afectan a los protocormos ya que no cuentan con la protección de la testa de la semilla. Esto difiere de lo reportado con Baig *et al.*, (2016), ya que en explantes de *Rosa* spp. tratados con colchicina se encontró mayor tamaño en la altura de la planta. Respecto a las variables número de hojas, número de raíces y longitud de estas, el efecto es muy parecido a las plantas que provienen de semillas tratadas con diferentes agentes antimitóticos, pero en proporciones más pequeñas o por debajo de las plantas originadas de semillas tratadas.

Respecto al número de cromosomas dentro de la familia Orchidaceae se presenta una gran variación en el número cromosómico (Félix y Guerra 2010; Daviña *et al.*, 2009). Para el caso del género *Laelia* cuenta con 11 especies (White, 1996; Lee *et al.*, 2007) de las

cuales se han reportado un número cromosómico variable desde 20 (Félix y Guerra, 2010) hasta 60 (Kamemoto, 1950). Raya-Montaña reporta para *Laelia halbilgeriana* $2n = 36$.

VI. CONCLUSIONES

La colchicina y orizalina afectan la viabilidad de semillas y la supervivencia de protocormos de las orquídeas *L. autumnalis* y *O. tigrinum*.

La altura, número de hojas, número y longitud de raíces de plántulas originadas de semillas se ven menos afectadas por la concentración y tiempo de exposición de las sustancias antimitóticas, que las originadas de protocormos tratados con diferentes concentraciones de agentes antimitóticos.

La concentración de 0.1 % de colchicina aplicada durante un día, presenta plántulas con características potencialmente poliploides.

Se determinó el número cromosómico para *L. autumnalis* en $2n=56$.

Para inducir poliploidía en la orquídea *L. autumnalis* se recomienda utilizar protocormos sometidos a colchicina a concentraciones mayores a 0.1 % durante un día de exposición a esta solución.

VII. LITERATURA CITADA

- Alomia, Y. A., A. T. Mosquera-Espinosa, N. S. Flanagan, J. T. Otero (2017).** Seed viability and symbiotic seed germination in *Vanilla* spp. (Orchidaceae). Research Journal of Seed Science 10: 43-52.
- Aqeel, R., M. Zehra, S. K. Kazmi, S. Khan, H. A. Kayani, A. A. Mirbahar (2016).** A study on the isolation of protoplasts from mesophyll cell of *Dendrobium* Queen Pink. Pakistan Journal of Botany 48 (2): 693-697.
- Arumuganathan K. and E. Earle (1991).** Estimation of nuclear DNA content of plants by cytometry. Plant Molecular Biology Report 9(3): 229-233.
- Atichart P. (2013).** Polyploid induction by colchicines treatments and plant regeneration of *Dendrobium chrysotoxum*. Thai Journal of Agriculture Science 46(1): 59-63.
- Azmi T. K. K., D. Sukma, S. A. Aziz, M. Syukur (2016).** Polyploidy induction of moth orchid (*Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume) by colchicine treatment on pollinated flowers. The Journal of Agriculture Sciences 11(2): 62-73.
- Baig M. M. Q., T. Ahmad, I. A. Hafiz, N. A. Abbasi, M. J. Tareen (2016).** *In vitro* improvement of characters in *Rosa* spp. Through colchicine. The Journal of Animal & Plant Sciences 26(6): 1666-1674.
- Barthlott W., B. Große-Veldmann, N. Korotkova (2014).** Orchid seed diversity: A scanning electron microscopy survey. Berlin: Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem. – Englera 32 pp.
- Barsberg, S., H. N. Rasmussen, N. Kodahl (2013).** Composition of *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) seeds analysed by attenuated total reflectance IR

spectroscopy: in search of understanding longevity in the ground. *American Journal of Botany* 100: 2066-2073.

Bateman, R. M., A. R. M. Murphy, B. G. Tattersall (2017). x *Dactyloдения lacerta* (Orchidaceae): a morphologically cryptic hybrid orchid new to science from the Lizard Peninsula, Cornwall. *New Journal of Botany* 7:64-77.

Beutelspacher, C. R., I. Moreno-Molina (2014). Hallazgo de híbridos naturales entre *Prosthechea cochleata* (L.) W. E. Higgins y *Prosthechea radiata* (Lindl.) W. E. Higgins (Orchidaceae), en Chiapas, México. *Lacandonia* 8: 51-56.

Botelho B. S. F., C. Rodrigues S., A. Bruzi T. (2015). Ornamental Plant Breeding. *Ornamental Horticulture* 21(1): 9-16.

Cardoso, J. C., A. P. Martinelli, J. A. Teixeira da Silva (2016). A novel approach for the selection of *Cattleya* hybrids for precocious and season.-Independent flowering. *Euphytica* 210:143-150.

Cardoso, J. C. (2010). *Laeliocattleya* "Brazilian Girl Rosa": cultivar de orquídea para cultivo em vaso. *Horticultura Brasileira* 28:378-381.

Chen C., X. Hou, H. Zhang, G. Wang, L. Tian (2011). Induction of *Anthurium andraeanum* "Arizona" tetraploid by colchicines *in vitro*. *Euphytica* 181: 137-145.

Chen W. H., C. Y. Tang, T. Y. Lin, Y. C. Weng, Y. L. Kao (2011). Changes in the endopolyploidy pattern of different tissues in diploid and tetraploid *Phalaenopsis Aphrodite* subsp. *Formosana* (Orchidaceae). *Plant Science* 181:31-38.

Christenhusz, M. J. M., J. W. Byng (2016). The number of known plant species in the world and its annual increase. *Phytotaxa* 261(3): 201-217.

- Colombo, R. C., R. Thibes H., E. A. Preti F., G. A. Cito A., R T. de Faria (2017).** *Cattleya forbesii* x *Cattleya bowringiana*: a new hybrid of *Cattleya* orchid. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 17: 184-186.
- Custódio, C.C., T. R. Marks, H. W. Pritchard, S. T. Hosomi, N. B. Machado-Neto (2016).** Improved tetrazolium viability testing in orchid seeds with a thick caparace (*Dactylorhiza fuchsii*) or dark seed coat (*Vanda curvifolia*). *Seed Science and technology*. 44: 177-188.
- Devadas, R., R. P. Medhi, S.P. Das (2010).** Interspecific hybrid developed in *Epidendrum* orchid from the *E. radicans* Pav. ex. Lind. X *E. xanthinum* Lindk. *Journal of Horticultural Sciences* 5(2):144-147.
- Dhooghe E., K. Van Laere, T. Eeckhaut, L. Leus, J. Van Huylenbroeck (2011).** Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 104:359-373.
- Dhooghe E., S. Denis, T. Eeckhaut, D. Reheul, M. C. Van Labeke (2009).** *In vitro* induction of tetraploids in ornamental *Ranunculus*. *Euphytica* 168:33-40.
- Dressler R.L. (2005).** How many orchis specied? *Selbyana* 26: 155-158.
- Emeterio-Lara, A., V. Palma-Linares, L. M. Vázquez-García, J. Mejía-Carranza (2016).** Usos y comercialización de orquídeas silvestres en la región sur del Estado de México. *Polibotánica* 42:197-214.
- Espejo S. A. (2012).** El endemismo de las Liliopsida mexicanas. *Acta Botanica Mexicana* 100: 195-257.
- Gantait S., N. Mandai, S. Bhattacharyya, P. Kanti D. (2011).** Induction and identification of tetraploids using *in vitro* colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. *Sciella*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 106:485-493.

- Garibay I., C.A. (2015).** Variabilidad entre progenies de *Phalaenopsis* cultivadas *in vitro*. Tesis de maestría en Ciencias. Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 122 p.
- Givnish T. J., D. Spalink, M. Ames, S. P. Lyon, S. J. Hunter, A. Zuluaga, W. J. D. Iles, M. A. Clements, M. T. K. Arroyo, J. Leebens-Mack, L. Endara, R. Kriebel, K. M. Neubig, W. M. Whitten, N. H. Williams, K. M. Cameron (2015).** Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282.
- Hernández M., S. (2012)** Caracterización fenotípica de *Laelia autumnalis* (Lex.) Lindl. (Orchidaceae) en Michoacán, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Michoacán, México, 52 p.
- Hernández-Muñoz, S., M. E. Pedraza-Santos, P. Antonio-López, E. De La Cruz-Torres, S. P. Fernández-Pavía, A. Martínez-Palacios, M. Martínez-Trujillo (2017).** Determinación de la DL₅₀ y GR₅₀ con rayos gamma (⁶⁰Co) en protocormos de *Laelia autumnalis in vitro*. *Agrociencia* 51 (5): 507-524.
- Hinsley, A., H. J. De Boer, M. F. Fay, S. W. Gale, L. M. Gardiner, R. S. Guanasekara, P. Kumar, S. Masters, D. Metusala, D. L. Roberts, S. Veldman, S. Wong, J. Phelps (2017).** A review of the trade in orchids and its implications for conservation. *Botanical Journal of the Linnean Society*. XX: 1-21.
- Hong-Xian, H., L. Yi-Jyun, T. Chii-Gong, L. Min-Jeng, C. Yun-Jin, K. Swee-Suak (2016).** Efficient and heritable transformation of *Phalaenopsis* orchids. *Botanical Studies* 57:1-12

- Hossain M. M., K. Ravi, P. Thanh V., B. Winarto, S. Zeng, J. A. Teixeira S. (2013).** The application of biotechnology to orchids. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 32: 69-139.
- Hyun-Jeong, L., K. Young-Eun, Y. Yeo-Joong, J. Cheol-Seung, L. Mei L., P. Kee-Yoeup, P. So-Young (2016).** Highly endoreduplicated floral organs of somaclonal variants in clonally propagated *Phalaenopsis* "Spring Dancer". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 126: 67-77.
- Hyun-Jeong, L., Y. Yeo-Joong, J. P. Kee-Yoeup, P. So-Young (2017).** Endoreduplication and gene expression in somaclonal variants of clonally propagated *Phalaenopsis* "Wedding Promenade". *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 58 (1): 85-92.
- Kazi N. A., P. T. Dawane, U. H. Patil (2015).** Polyploidy in ornamentals. *Journal of Global Biosciences* 4(3): 1768-1773.
- Kuligowska K., H. Lütken, R. Müller (2016).** Towards development of new ornamental plants: status and progress in wide hybridization. *Planta* 244: 1-17
- Kuzichev O. B. and N. Y. Kuzicheva (2016).** Innovative processes in floriculture: current status, problems and prospects. *Indian Journal of Science and Technology* 9(16): 1-7.
- Lee, Y. M., H. J. Lee, Y. S. Kim, S. Y. Kang, D. S. Kim, J. B. Kim, J. W. Ahn, B. K. HA, S.H. Kim (2016).** Evaluation of the sensitivity to ionising γ -radiation of a *Cymbidium* hibrid. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 91(2): 109-116.
- Lin S., H. C. Lee, W. H. Chen, C. C. Chen, Y. Y. Kao, Y. M. Fu, Y. H. Chen, T. Y. Lin (2001).** Nuclear DNA Contents of *Phalaenopsis* sp. And *Doritis pulcherrima*. *Journal American Society Horticultural Science* 126:195-199.

- Liu H., Y. B. Lou, J. Heinen, M. Bhat, Z. J. Liu, (2014).** Eat your orchid and have it too a potentially new conservation formula for chinese epiphytic medicinal orchids. *Biodiversity Conservation* 23: 1215-1228
- Lûtken H., J. Clarke, R. Müller (2012).** Genetic engineering and sustainable production of ornamentals: current status and future directions. *Plant Cell Reports* 31(7): 203-207.
- Manzoor A., T. Ahmad, M. A. Bashir, M. M. Qadeer B., A. Ahad Q., M. K. Nawaz S., I. Ahmed H. (2018).** Induction and identification of colchicine induced polyploidy in *Gladiolus grandiflorus* "White Prosperity". *Folia Horticulturae* 30(2): 307-319.
- Marques I., Draper D., Riofrío L., Naranjo C. (2014).** Multiple hybridization events, polyploidy and low postmating isolation entangle the evolution of neotropical species of *Epidendrum* (Orchidaceae). *BMC Evolutionary Biology* 14: 20.
- Martínez-Rivera, B. y L. Beltrán-Rodríguez (2009).** Etnoecología de la flor de Calavera. *El Tlacuache Suplemento Cultural, Centro INAH Morelos y La Jornada Morelos*, 374:1.
- Martínez-Rivera, B., L. Beltrán-Rodríguez y A. Paulo-Maya. (2010).** Dinámica ceremonial en los días de muertos al sur del estado de Morelos. *Tlacuache Suplemento Cultural, Centro INAH Morelos y La Jornada Morelos*, 411:2.
- Matos, Á. (2014).** Efecto de diferentes concentraciones y tiempos de exposición de la colchicina en plantas de zábila [*Aloe vera* (L.) Burm. f.] in vivo. *Multiciencias* 14(4), 382-388
- Mebakerlin M. S. and S. Chakravorty (2015).** Value Addition in Flowers; *In: Value Addition of Horticultural Crops Recent Trends and Future Directions*. A. B. Sharangi and S. Datta (eds). Springer India. pp: 83-99.

- Mi Y. C., K. Chang Y., M. Jeon S., L. Do-Jin, N. Aung H., C. Jae Dong., K. Chang K. (2014).** *In vitro* induction of tetraploids in an interspecific hybrid of *Calanthe* (*Calanthe discolor* x *Calanthe sieboldii*) through colchicines and oryzalin treatments. *Plant Biotechnology Reports* 8:251-257.
- Morejohn L. C., E. Bureau T., J. Molebajer, S. Bajer A., E. Fosket D. (1987)** Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro. *Planta* 172:252–264.
- Mori S., T. Yamame, M. Yahata, K. Shinoda, N. Murata (2016).** Chromosome Doubling in *Limonium bellidifolium* (Gouan) Dumort. by colchicine treatment of seeds. *The Horticulture Journal* 85(4): 366-371.
- Paek KY, Hahn EJ, Park SY (2011).** Micropropagation of *Phalaenopsis* orchids via protocorms and protocorm-like bodies. In: Thorpe TA, Yeung EC (eds) *Plant embryo culture: methods and protocols*. Springer, Dordrecht, pp 293–306.
- Pantoja-Ambriz, J., M. E. Pedraza-Santos, P. A. López, P. Apáez B. (2016).** Distribución y caracterización morfológica de genotipos silvestres de *Cuitlauzina pendula* Lex. (Orchidaceae). *Interciencia* 41(12): 819-825.
- Phuong T. N. T., K. Ureshino, I. Miyamija, Y. Ozaki, H. Okubo (2003).** Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 72:19-25.
- Popova E., K. Haeng-Hoon, P. Kumar S., F. Engelmann, H. W. Pritchard. (2016).** Frozen beauty: The cryobiotechnology of orchid diversity. *Biotechnology Advances* 34(4) 380-403.
- Ranney T. G. (2006).** Polyploidy: From evolution to new plant development. *Combined Proceedings International Plant Propagators Society* 56: 137-142.

- Sadat N. S. A., M. Norouzi, G. Karimzadeh, K. Shirkoob, M. Niazián (2017).** Effect of colchicine-induced polyploidy on morphological characteristics and essential oil composition of ajowan (*Trachyspermum ammi* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 130(3): 543-551.
- Salazar M. S. A., G. J. Valderrama R., J. D. Quintero C. (2018).** Efecto de la colchicine sobre la morfología foliar y los estomas de *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier (Crassulaceae). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 12(1): 212-222.
- Sattler C. M., R. C. Carvalho, W. R. Clarindo (2016).** The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta* 1:243-281.
- Schaart J. G., C. C. M. Van de Wiel, L. A. P. Lotz, M. J. M. Smulders (2016).** Opportunities for products of new plant breeding techniques. *Trends in Plant Science*. 21: 438-449.
- Seaton K., A. Bettin and H. Grüneberg (2014).** New ornamental plants for horticulture. *In: Horticulture Plants for People and Places, Volume 1.* G. R. Dixon and D. E. Aldous (eds). Springer Dorcrecht. pp: 435-463.
- SEMARNAT (2016) Norma oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010** Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. In: Lista de especies en riesgo. Instituto Nacional de Ecología.
- Serrato M., M. Hernández, Y. Savidan, N. Bárcenas (2000)** Contenido de ADN y nivel de ploidia en *Tagetes* spp. utilizando citometría de flujo. *Agrociencia* 34(6): 729-734.

- Sheela, V. L., A. Shenna (2014).** Novel trends and achievements in breeding of tropical ornamental crops especially orchids and anthuriums: the mutation breeding approach. *In: Mutagenesis: Exploring Genetic Diversity of Crops.* N. B. Tomlekova, M. I. Kozgar and M. R. Wani (Eds.). Wageningen, The Netherlands: Academic Publishers. pp. 141-157.
- Shu-Hong, L., L. Chia-Wen, L. Chia-Hui, C. Pao-Yi, L. Li-Jen, L. Choun-Sea, C. Ming-Tsair (2015).** Establishment of an *Agrobacterium*-mediated genetic transformation procedure for the experimental model orchid *Erycina pusilla*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 120: 211-220.
- SNICS (2016).** Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas
- Solano G., R., G. Cruz L., A. Martínez F., L. Lagunez R. (2010).** Plantas utilizadas en la celebración de la semana santa en Zaachila, Oaxaca, México. *Polibotanica* 29: 263-279.
- Suárez G., L., (2014).** Informe de nueva variedad *Spathoglottis* “Ecos de Festivalia”, nuevo híbrido de orquídea terrestre obtenido en cuba. *Cultivos Tropicales*, 35(3):89.
- Szeszko, F. D. R. (2011).** La Orquideoflora Mexiquense. Secretaria de Educación del Gobierno del Estado de México. Estado de México. 358 p.
- Tamayo-Ordóñez M. C., L. A. Espinosa-Barrera, Y. J. Tamayo-Ordóñez, B. Ayil-Gutiérrez, L. F. Sánchez-Teyer (2016).** Advances and perspectives in the generation of polyploid plant species. *Euphytica* 209:1-22.

- Teixeira S., J. A., J. Dobránszki, J. C. Cardoso, S. F. Chandler, S. Zeng (2016).** Methods for genetic transformation in *Dendrobium*. Plant Cell Reports 35 (3): 483-504).
- Teixeira S. J. A., C. D.Poh, V. P.Thanh, M.Mii (2011).** Transgenic orchids. Scientia Horticulturae 130: 673-680.
- Tejeda-Sartorius, O., M. A. A. Téllez-Velazco, L. I. Trejo-Téllez (2017).** Características ornamentales de orquídeas silvestres y su propagación con fines comerciales. Alternativa de aprovechamiento sustentable *ex situ*. Agroproductividad 10(6): 37-45.
- Tilden P. M., L. Kenneth W. (2011).** *In vitro* polyploidy induction of orchids using orizalin. Scientia Horticulturae 130:314-319
- Uyen, N. H. P., V. T. T Ha (2012).** In vitro mutation breeding of *Paphiopedilum* by ionization radiation. Scientia Horticulturae 144: 1–9.
- Vij S. P. and P. Pathak (2012).** Orchid diversity: conservation and Utilization. Proceedings of the National Academy of Sciences, India, Section B: Biological Sciences 82(2): 295-300.
- Wannajindaporn, A., C. Kativat, P. A. Tantasawat (2016).** Mutation induction of *Dendrobium "Earsakul"* using sodium azide. Hortscience 51(11):1363-1370.
- Wilkins H., and N. O. Anderson (2006).** Creation of new floral products. *In: Flower Breeding and Genetics Issues, Challenges and Opportunities for the 21st century.* (N. O. Anderson (ed). Springer Netherlands pp: 49-64.
- Yeung, E. C. (2017).** A perspective on orchid seed and protocorm development. Botanical Studies 58: 1-14.

Zhang J., M. Zhang, X. Deng (2007). Obtaining autotetraploids *in vitro* at a high frequency in *Citrus sinensis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 89: 211-216.

Zhou, K., P. Fleet, E. Nevo, X. Zhang, G. Sun (2017). Transcriptome analyses reveals plant response to colchicine treatment during on chromosome doubling. *Scientific Reports* 1:1-11.