



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA  
PRESIDENTE JUAREZ

ÁREA TEMÁTICA DE FISIOLOGÍA Y GENÉTICA VEGETAL

## **Variabilidad entre progenies de *Phalaenopsis* cultivadas *in vitro***

TESIS

**ING. CARLOS ALBERTO GARIBAY INFANTE, Correo E:**

**Para obtener el título como Maestro en Ciencias Biológicas**

**TUTORA: DOCTORA EN FISIOLOGÍA VEGETAL MARTHA ELENA PEDRAZA SANTOS,**

Morelia, Michoacán, Octubre del 2015



## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por haberme brindado la oportunidad de continuar con mi formación académica y por haber contribuido notablemente al profesionalista que soy.

A la Dra. Martha Elena Pedraza Santos por todo el apoyo, asesoría y paciencia brindada durante la realización de este documento.

A los Doctores Patricio Apaez Barrios, José López Medina, Alejandro Martínez Palacios, Nicolás Gutiérrez Rangel y Blanca Nieves Lara Chávez quienes conforman mi comité por todas sus aportaciones y consejos que sirvieron para mejorar el presente trabajo.

Al Dr. Sergio Segura y a la M.C. Carmen Herrera, por brindarme la oportunidad y facilidades de laborar con ellos en el Centro Regional Centro Occidente de la Universidad Autónoma Chapingo.

A la Dra. Barbara Ruffoni directora del Instituto experimental de la Floricultura ubicado en San Remo, Italia. Por darme la oportunidad de colaborar con ellos y por todo su apoyo tanto técnico como personal.

A CONACYT por brindar los recursos económicos necesarios para que yo pudiera cumplir con este objetivo profesional.

## DEDICATORIA

A Dios, por guiarme siempre por un buen camino y ayudarme en los momentos difíciles de mi vida.

A mis padres, Carlos Alberto Garibay Cornejo y Rosa María Infante González por brindarme siempre todo su apoyo incondicional, por sus consejos, su experiencia, por todo su amor, por enseñarme como conducirme por la vida, por motivarme en todo momento, por eso y muchísimas cosas más, los amo, gracias por todo papás.

A mis hermanos, Luis Arturo Garibay Infante y Daniel Alejandro Garibay Infante, que aparte de hermanos también son mis mejores amigos y las personas más importantes con las que sé que siempre podré contar.

A mi familia, en especial a Francisco Javier Garibay Cornejo y a Angélica Almanza Soria por todo su apoyo, sus buenos consejos y amistad durante toda mi formación como profesionalista.

A mis primos, gracias por los momentos tan buenos que siempre paso con ustedes, y espero les sirva de inspiración.

Y finalmente a todos mis amigos, Gil Jorge, Hugo, Christopher, Isaac, Jerry, Daniel, Horacio, Fernando, Mike, Javo, Marco, Benja, Luardo, Zu, Gus, Fanny, Ivan, Jenny, Bibiana, Ulises, Roberto y los que me faltaron, gracias por todos esos buenos excelentes momentos y brindarme su amistad.



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

---

DR. HÉCTOR GUILLÉN ANDRADE  
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
P R E S E N T E

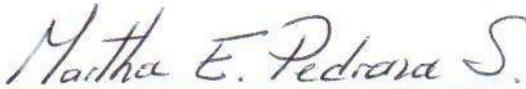
Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Variabilidad entre progenies de *Phalaenopsis* cultivadas *in vitro*" presentado por el ING. CARLOS ALBERTO GARIBAY INFANTE, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestro en Ciencias.

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

ATENTAMENTE

Morelia, Michoacán, a 26 de agosto de 2015

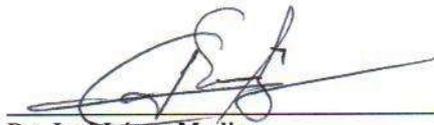
MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA



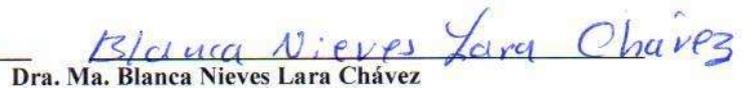
Dra. Martha Elena Pedraza Santos  
Directora de Tesis



Dr. Alejandro Martínez Palacios



Dr. José López Medina



Dra. Ma. Blanca Nieves Lara Chávez



Dr. Nicolás Gutiérrez Rangel

## CONTENIDO

	Página
Índice de cuadros.....	7
Índice de figuras.....	8
Resumen.....	10
Abstract.....	11
<b>I. Introducción general.....</b>	<b>12</b>
<b>Hipótesis y objetivo.....</b>	<b>14</b>
<b>II. Revisión de literatura.....</b>	<b>15</b>
2.1 Importancia cultural y económica de <i>Phalaenopsis</i> .....	15
2.2 Origen, clasificación taxonómica y descripción de la flor.....	17
2.3 Mejoramiento genético de <i>Phalaenopsis</i> .....	18
2.4 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Phalaenopsis</i> .....	20
2.5 Citometría de flujo en orquídeas.....	22
2.6 Requerimientos del cultivo de <i>Phalaenopsis</i> .....	24
2.6.1 Sustrato.....	27
2.6.2 Sistema de riego.....	27
2.6.3 Nutrición.....	28
2.6.4 Temperatura.....	29
2.6.5 Intensidad luminosa.....	30
2.6.6 Humedad relativa.....	31
<b>III. Literatura citada.....</b>	<b>33</b>
<b>Capítulo I. Compatibilidad y obtención de híbridos intervarietales de</b>	
<b><i>Phalaenopsis</i>.....</b>	<b>42</b>
Resumen y abstract.....	43
<b>I. Introducción.....</b>	<b>45</b>
<b>II. Materiales y métodos.....</b>	<b>49</b>
2.1 Cruzas intervarietales de <i>Phalaenopsis</i> .....	49
2.2 Obtención de plántulas mediante cultivo <i>in vitro</i> .....	51
2.3 Medición del contenido de ADN nuclear mediante citometría de	

flujo.....	52
<b>III. Resultados y discusión.....</b>	<b>55</b>
3.1 Cruzas intervarietales de <i>Phalaenopsis</i> .....	55
3.2 Obtención de plántulas mediante cultivo <i>in vitro</i> .....	58
3.3 Medición del contenido de ADN nuclear mediante citometría de flujo.....	62
<b>IV. Conclusiones.....</b>	<b>68</b>
<b>V. Literatura citada.....</b>	<b>69</b>
<b>Capítulo II. Regeneración <i>in vitro</i> de <i>Phalaenopsis</i> a partir de explantes de hojas.....</b>	<b>77</b>
Resumen y abstract.....	78
<b>I. Introducción.....</b>	<b>80</b>
<b>II. Materiales y métodos.....</b>	<b>83</b>
<b>III. Resultados y discusión.....</b>	<b>86</b>
<b>IV. Conclusiones.....</b>	<b>102</b>
<b>V. Literatura citada.....</b>	<b>103</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>109</b>

## Índice de cuadros

	Página
<b>Cuadro 1.</b> Fases de desarrollo del cultivo de <i>Phalaenopsis</i> y espacio entre plantas .....	26
<b>Cuadro 2.</b> Recomendaciones de fertilización para el desarrollo de <i>Phalaenopsis</i> .....	29
<b>Cuadro 3.</b> Requerimientos de luz para <i>Phalaenopsis</i> .....	31
<b>Cuadro 4.</b> Relación de frutos formados entre número de intentos de polinización en cruzas de ocho variedades de <i>Phalaenopsis</i> .....	56
<b>Cuadro 5.</b> Contenido de ADN nuclear de ocho variedades parentales de <i>Phalaenopsis</i> obtenidos mediante citometría de flujo.....	63
<b>Cuadro 6.</b> Cuadrados medios y significancia del análisis de varianza para el efecto del ácido naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA) en explantes de <i>Phalaenopsis</i> .....	86
<b>Cuadro 7.</b> Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto del balance de ácido naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA) sobre tres variables estudiadas en explantes de <i>Phalaenopsis</i> cultivados <i>in vitro</i> .....	92
<b>Cuadro 8.</b> Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto del medio de cultivo y la concentración de benciladenina (BA) en cinco variables estudiadas durante la micropropagación de <i>Phalaenopsis</i> .....	98

## Índice de figuras

	Página
<b>Figura 1.</b> Flor de <i>Phalaenopsis</i> .....	18
<b>Figura 2.</b> Variedades de <i>Phalaenopsis</i> utilizadas en el presente trabajo.....	49
<b>Figura 3.</b> Hibridación intraespecífica en <i>Phalaenopsis</i> .....	50
<b>Figura 4.</b> Cultivo <i>in vitro</i> de progenies de <i>Phalaenopsis</i> .....	51
<b>Figura 5.</b> Proceso de extracción de ADN nuclear para citómetro de flujo.....	53
<b>Figura 6.</b> Porcentaje de capsulas formadas cuando se utilizaron las ocho variedades de <i>Phalaenopsis</i> como progenitores masculinos.....	55
<b>Figura 7.</b> Peso fresco de plántulas de <i>Phalaenopsis</i> obtenidas de las cruzas realizadas.....	58
<b>Figura 8.</b> Numero de plántulas de <i>Phalaenopsis</i> obtenidas de las cruzas realizadas.....	59
<b>Figura 9.</b> Número de hojas de plántulas de <i>Phalaenopsis</i> por unidad experimental. Cruzas.....	60
<b>Figura 10.</b> Numero de raíces de <i>Phalaenopsis</i> por unidad experimental.....	61
<b>Figura 11.</b> Histogramas obtenidos mediante citómetro de flujo Attune® Acoustic utilizando como fluorocromo yoduro de propidio.....	66
<b>Figura 12.</b> Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> de <i>Phalaenopsis</i> a partir de secciones de hoja.....	83
<b>Figura 13.</b> Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> de <i>Phalaenopsis</i> a partir de hojas de plántulas.....	84
<b>Figura 14.</b> Respuesta morfogénica <i>in vitro</i> de secciones de hojas de <i>Phalaenopsis</i> a la interacción de ácido naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA) en diferentes concentraciones.....	87
<b>Figura 15.</b> Influencia de la concentración de benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) sobre la necrosis de explantes de secciones de hojas de <i>Phalaenopsis</i> cultivadas <i>in vitro</i> .....	88
<b>Figura 16.</b> Influencia de la concentración de benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) sobre la liberación de fenoles al medio de cultivo de explantes de secciones de hojas de <i>Phalaenopsis</i> .....	89

<b>Figura 17.</b> Respuesta morfogénica de explantes de hojas de <i>Phalaenopsis</i> en respuesta a diferentes concentraciones de benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA).....	<b>92</b>
<b>Figura 18.</b> Explantes de hojas de <i>Phalaenopsis</i> que presentaron necrosis por efecto de los tratamientos en diferentes concentraciones de BA y ANA (Experimento 2).....	<b>93</b>
<b>Figura 19.</b> Efecto del ácido naftalenacético (ANA) en diferentes concentraciones sobre la necrosis de explantes de hojas de <i>Phalaenopsis</i> cultivadas <i>in vitro</i> (Experimento 2).....	<b>94</b>
<b>Figura 20.</b> Efecto de la concentración de benciladenina (BA) sobre la necrosis de explantes de hojas de <i>Phalaenopsis</i> cultivadas <i>in vitro</i> .....	<b>95</b>
<b>Figura 21.</b> Formación de brotes a partir de hojas de <i>Phalaenopsis</i> cultivados <i>in vitro</i> y expuestos a concentraciones de 10 mg L <sup>-1</sup> de BA.....	<b>96</b>
<b>Figura 22.</b> Efecto de la benciladenina (BA) en diferentes concentraciones sobre la respuesta morfogénica en explantes de hojas de <i>Phalaenopsis</i> cultivadas <i>in vitro</i> (Experimento 3).....	<b>98</b>
<b>Figura 23.</b> Efecto de la concentración de benciladenina (BA) sobre la necrosis de explantes de hojas de <i>Phalaenopsis</i> cultivados <i>in vitro</i> .....	<b>98</b>
<b>Figura 24.</b> Efecto de la concentración de benciladenina (BA) sobre el número de brotes generados en explantes de hojas de <i>Phalaenopsis</i> cultivadas <i>in vitro</i> .....	<b>99</b>
<b>Figura 25.</b> Efecto de la concentración de benciladenina (BA) sobre las variables altura y ancho de brotes generados en explantes de hojas de <i>Phalaenopsis</i> cultivadas <i>in vitro</i> .....	<b>100</b>

## RESUMEN

*Phalaenopsis* es un género formado aproximadamente por 60 especies de orquídeas de la subfamilia *Epidendroideae* en la familia *Orchidaceae*. Son nativas del sudeste de Asia, desde las montañas del Himalaya hasta las Filipinas, Indonesia y Norte de Australia. La isla Orquídea de Taiwán, debe su nombre a estas orquídeas. Los híbridos de estas orquídeas son las más extendidas en Europa y América del Norte. Su popularidad viene de su gran adaptabilidad y de la belleza de este cultivo. Su cultivo ha sido desarrollado desde la mitad del siglo pasado porque muchos híbridos interespecíficos e intergenéricos fueron creados y comercializados con éxito por sus obtentores. La explotación comercial para flor cortada y el cultivo en maceta afecta a unos cincuenta géneros cuyo cultivo se practica en muchos países. A diferencia de otras especies de orquídeas, la forma de reproducción es difícil, ya que su crecimiento monopodial lento ha dificultado la multiplicación vegetativa de materiales selectos y la reproducción sexual se ha visto agravada en algunos híbridos por la presencia de altos niveles de esterilidad. Por ello, en el presente trabajo se realizaron cruza de diferentes híbridos comerciales de esta orquídea donde evaluamos el porcentaje de capsulas obtenidas así como las características de las progenies conseguidas mediante las cruza realizadas, por otra parte se generó un protocolo de multiplicación clonal *in vitro*, donde pudimos evaluar el uso de diferentes fitohormonas y las reacciones y resultados que se obtuvieron con los diferentes explantes de esta orquídea.

Palabras clave: Orquídea, híbridos, cruza, explantes y fitohormonas.

## ABSTRACT

*Phalaenopsis* is a genus consists of approximately 60 species of orchids of the *Epidendroideae* subfamily in the family *Orchidaceae*. They are native to Southeast Asia, from the Himalaya Mountains to the Philippines, Indonesia and northern Australia. Taiwan Orchid Island is named after these orchids. Hybrids of these orchids are the most widespread in Europe and North America. Its popularity comes from its adaptability and beauty of this crop. Its cultivation has been developed since the middle of last century because many interspecific and intergeneric hybrids were successfully created and marketed by its breeders. Commercial exploitation for cut flowers and potted culture affects some fifty genera whose cultivation is practiced in many countries. Unlike other species of orchids, the form of reproduction is difficult because its slow growth has hampered monopodial vegetative propagation of selected materials and sexual reproduction has been aggravated in some hybrids by the presence of high levels of sterility. Therefore, in this paper crosses of various commercial hybrids of this orchid which evaluated the percentage of capsules obtained and the characteristics of the progeny obtained through crosses made, moreover protocol clonal propagation *in vitro* generated were performed, where we could evaluate the use of different plant hormones and reactions and results obtained with different explants of this orchid.

Keywords: Orchid, hybrids, crosses, explants and plant hormones.

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La floricultura es una parte muy importante de la industria hortícola, el valor global de esta actividad se estima entre 100 y 150 millones de euros (150 millones de dólares en EE.UU.) con los principales mercados en Europa, Norteamérica y Japón (Chandler y Tanaka, 2007).

Según estimaciones del Consejo Mexicano de la Flor, en México la superficie para producción de ornamentales es de 15 000 ha, de las cuales 63.81 % son de cultivo a cielo abierto, 4.58 % en invernadero y 31.61 % en semi – invernadero; , la producción se concentra principalmente en los estados de México, Puebla, Morelos, Distrito Federal y Michoacán (Betancourt - Olvera *et al.*, 2005).

Un caso particular, con cada vez mayor interés en la floricultura es la producción de orquídeas en maceta, la cual se ha incrementado dramáticamente a lo largo del planeta en el último cuarto de siglo, debido a su gran valor económico y social comparado con otras especies y, hoy en día, constituyen uno de los principales grupos de especies en el mercado florícola mundial (Ichihashi, 1996; Kindlmann *et al.*, 2002).

Existen diversos géneros de orquídeas con muy buenas características para su comercialización; por ejemplo, entre 1993 y 2002, los más vendidos en Japón fueron: *Phalaenopsis* (30 %), *Dendrobium* (20 %), *Oncidium* (20 %), *Cymbidium* (15 %) y *Cattleya* (10 %).

En la actualidad las orquídeas son el segundo cultivo con mayor valor entre las flores cultivadas en maceta en los Estados Unidos, de éstas, entre el 70 y 90 % corresponden a *Phalaenopsis* (Griesbach, 2002).

Debido a su belleza y los altos valores que alcanza la producción de *Phalaenopsis*, hoy en día es motivo de cultivo por particulares e industriales como plantas ornamentales y para flor de corte.

La participación de México en la producción de orquídeas atractivas para el comercio mundial como *Phalaenopsis*, no corresponde con las ventajas que nuestro país posee, entre las que resaltan la ubicación geográfica ideal para facilitar su comercialización, así como una infraestructura sólida en investigación biotecnológica de plantas. Esto se debe a que en la producción y comercialización de *Phalaenopsis* se utilizan variedades generadas en otros países (Griesbach, 2002), lo que origina costos de producción elevados (por el pago de regalías) y disminución de ingresos para los productores.

Contribuir con nuevas variedades de *Phalaenopsis* para la industria florícola nacional es importante, ya que este sector, aunque es de gustos muy exigentes, siempre está en demanda nuevos colores y formas de flores. Hasta el momento no se ha dimensionado la importancia de generar variedades nacionales. Por ello, realizar cruza entre diferentes tipos de *Phalaenopsis* para obtener rasgos atractivos a nuevas variedades, combinado con el uso de técnicas de vanguardia como el cultivo *in vitro* para facilitar su multiplicación y reducción de tiempo, puede impactar positivamente el

mercado florícola nacional. Adicionalmente, la manipulación de plantas y flores también aumentan el valor comercial de las mismas (Brown y Thorpe, 1995; Chen y Wang, 1996; Chen *et al.*, 1998).

Por esto en la presente investigación se plantean la hipótesis y objetivos siguientes:

### **Hipótesis**

Es posible obtener progenies de *Phalaenopsis* con características deseables comerciales, por medio de cruza intraespecíficas y propagarlas *in vitro* a partir de secciones de hojas

### **Objetivo general**

Determinar el grado de compatibilidad entre híbridos de *Phalaenopsis*, evaluar sus progenies y establecer un sistema de propagación *in vitro* a partir de secciones de hojas.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Importancia cultural y económica de *Phalaenopsis*

*Phalaenopsis* es la flor nacional de Taiwán, esta orquídea fue descubierta y colectada por primera vez por japoneses en Lanyu (Isla de las Orquídeas) en 1897. Posteriormente, con esta especie se ganaron dos campeonatos consecutivos en la Exposición Internacional de Orquídeas en California, EE. UU. (1952 y 1953), fue de este modo que logró popularidad y admiración en todo el mundo (Chen y Wang, 1996).

Hoy en día, la industria de *Phalaenopsis* en el mundo está bien desarrollada y ha avanzado a una producción sistematizada bajo cubiertas en invernadero. Los principales mercados exportadores son Holanda y Taiwán, estos representan en la actualidad más de 80 % de la cuota de mercado global de esta especie (Granada y Acuña, 2010; SARGARPA, 2010).

El futuro de esta orquídea es brillante. En agosto de 2004, el New York Times informó que hay un mercado mundial de dos mil millones dólares para las orquídeas, y es *Phalaenopsis* la que lleva el liderazgo en ese mercado. También es reconocida como una de las más elegantes flores de interior por la American Orchid Society (AOS); en 2002 el Sr. Ed Matsui, propietario de Matsui Nursery, el mayor productor de esta especie en EE.UU., estimó un aumento cinco veces mayor para su mercado en los próximos diez años. Por otra parte, de acuerdo a la revista Flora Culture International (2004), el mercado de *Phalaenopsis*, creció 20 % anual en los últimos cinco años. Es la

flor más vendida entre todas las cultivadas en macetas en Holanda y Japón. Además, debido al incremento de ventas al menudeo como nuevo canal de distribución, la demanda ha aumentado, los costos de producción han disminuido y, las variantes de color han impulsado las ventas de flores en los últimos años (Griesbach, 2002).

Durante años, se ha avanzado en la investigación biotecnológica de *Phalaenopsis* en áreas como termo-tolerancia, resistencia a patógenos, control de la floración, color de la flor, diagnóstico de virus y propagación *in vitro*. El desarrollo tecnológico es la base de la industria y aunque se necesita gran cantidad de tiempo e inversión para construirla, es absolutamente esencial (Chen *et al.*, 2011).

Todos estos factores han posicionado a esta orquídea como uno de los productos de exportación más importantes del mundo. Con un clima óptimo para el cultivo de *Phalaenopsis*, México está muy bien situado para su comercialización, al tener cerca a Estados Unidos y Canadá lo que facilitaría la exportación.

## 2.2 Origen, clasificación taxonómica y descripción de la flor

La planta es epífita, monopodial y nativa del sudeste de Asia. Como resultado de su extensa hibridación, está disponible en diversos tamaños y colores de flores. Su nombre procede del griego phalaina = “mariposa” y ophis = “parecido”, debido a que las inflorescencias recuerdan a mariposas en vuelo, por ello, se le conoce como “orquídea mariposa” (Takasaki, 1989; Vásquez y Frier, 1991). Su clasificación taxonómica de acuerdo con USDA (2010) es la siguiente:

Reino: *Plantae*

Sub-reino: *Tracheobionta*

Superdivisión: *Spermatophyta*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Liliopsida*

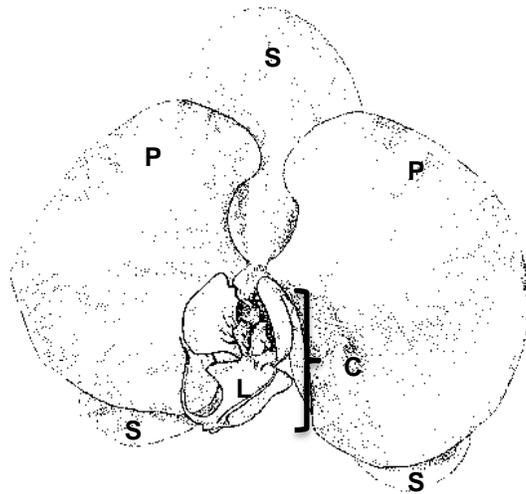
Subclase: *Liliopsida*

Orden: *Orchidales*

Familia: *Orchidaceae*

Género: *Phalaenopsis* sp.

Esta orquídea se distingue por sus flores grandes y vistosas, de diversos colores y tamaños, con tres sépalos y tres pétalos; uno de estos pétalos es conocido como labio o labelo y suele ser diferente del resto en tamaño, forma y coloración; es en general la parte más vistosa de la flor y tiene la función de atraer, guiar o servir como plataforma de aterrizaje a los polinizadores (Figura 1).



**Figura 1.** Flor de *Phalaenopsis* sp. S) Sépalos, P) Pétalos, L) Labelo y C) Columna.

Otra característica distintiva de las flores de las orquídeas la constituye la parte reproductiva, ya que por lo general presentan fusión parcial que incluye los órganos sexuales masculinos (estambres y anteras) y femeninos (ovario, estilo y estigma), para constituir una estructura llamada columna o ginostemio, la cual se encuentra generalmente en el centro de la flor (La Croix, 2000 y Hágsater *et al.*, 2005).

### **2.3 Mejoramiento genético de *Phalaenopsis***

Los mejoradores de *Phalaenopsis* están interesados en cuatro características florales; el tamaño, la forma, el color y su consistencia (Griesbach, 1981). En las *Phalaenopsis* blancas la perfección en términos de tamaño, forma y consistencia se logró gracias a los resultados obtenidos por la poliploidía. La cual, además de incrementar el número cromosómico, también conlleva a aumentar el volumen celular,

responsable del incremento en tamaño y consistencia de las flores, así como en el mejoramiento de su forma (Vaughn y Vaughn, 1973 y Freed, 1978).

En la actualidad además de buscar tamaño, forma y la consistencia que poseen las variedades blancas, se pretende que las nuevas variedades posean colores novedosos y llamativos. Para lograr estos resultados, la poliploidia es uno de los procesos clave. Hay diversas formas de inducirla, algunos de los protocolos son los descritos por MacLeod en 1947 y Rotor en 1958; que conllevan el sumergir plántulas en solución de colchicina.

Otra técnica consiste en seleccionar los materiales parentales que se utilizarán para generar cruces y de esta forma obtener híbridos superiores y de excelente calidad comercial (Chen *et al.*, 1998). Las variedades de *Phalaenopsis* que se utilizan para el mejoramiento, usualmente se dividen en dos grupos, el grupo estándar de flores grandes y el grupo de novedad (Chen *et al.*, 1999).

En general, los programas de mejoramiento están diseñados para mejorar el tamaño y el color de las flores, así como otras características como: longevidad, largo del tallo, forma de la hoja, facilidad de propagación, resistencia a plagas y enfermedades y mayor número de semillas viables; todo esto a través de la selección de buenos materiales parentales para la hibridación (So-Young *et al.*, 2010).

El desarrollo de una variedad nueva de *Phalaenopsis* comienza desde que se realiza el cruzamiento hasta que se obtiene la semilla, esto tarda aproximadamente seis meses;

posteriormente desde la siembra en el laboratorio hasta la pequeña planta *in vitro*, un año y; desde la pequeña planta *in vitro* hasta que florece, 1 año y medio. Todo este proceso puede alcanzar fácilmente de 7 a 9 años; sólo a partir de este punto puede iniciarse el proceso de reproducción en masa, lo cual requiere varios años más.

#### **2.4 Cultivo *in vitro* de *Phalaenopsis***

El cultivo de las plántulas *in vitro* requiere condiciones especiales. Los beneficios que ofrecen el cultivo de tejidos, son una menor pérdida de plantas y que acortan el período de cultivo en unos 5 o 7 meses. Las plántulas del cultivo *in vitro* están listas para su trasplante cuando tienen 2 o 3 hojas de 10 a 14 cm de tamaño, aunque antes de plantarlas en macetas deben primero clasificarse (Anthura, 2007 y 2010).

En 1909, Hans Burgeff de Alemania y Noel Bernard de Francia reportaron de forma independiente que las semillas de orquídeas germinaban sólo en presencia de un hongo simbiótico. Este descubrimiento hizo posible la producción de orquídeas pero aún así la germinación simbiótica de *Phalaenopsis* continuaba siendo muy difícil y altamente demandante de tiempo (Griesbach, 2002). Knudson L. (1946) en la Universidad de Cornell describió un método mediante el cual era posible germinar las semillas de orquídeas solamente usando agar y sales minerales. Las técnicas de cultivo *in vitro*, han permitido obtener grandes volúmenes de *Phalaenopsis* con el fin de producir plantas a gran escala para el comercio (Leva y Rinaldi, 2012).

En décadas recientes, el uso de técnicas basadas en el cultivo *in vitro*, ha hecho posible el desarrollo de herramientas biotecnológicas para identificar problemas en el mejoramiento de cultivos en la agricultura (Sakhanokho y Kelley, 2009). El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales ha sido ampliamente utilizado para la multiplicación de plantas a gran escala. También como herramienta en la investigación, en los últimos años ha sido fundamental para las áreas de propagación vegetal, eliminación de enfermedades, mejoramiento genético y producción de metabolitos secundarios (Akin-Idowu *et al.*, 2009). El cultivo *in vitro* de tejidos es considerado como la herramienta más eficiente para el mejoramiento genético de cultivos ya que puede generar la producción de un gran número de variantes somaclonales y gametoclonales, y tiene el potencial de producir plántulas de alta calidad con tolerancia a condiciones adversas y resistencia a enfermedades (Brown y Thorpe, 1995). El cultivo *in vitro* de tejidos permite entender la fisiología y bioquímica de los cultivos en condiciones adversas (Benderradji *et al.*, 2012). Muchos estudios han reportado que el cultivo *in vitro* por si solo o combinado con alguna otra técnica como la inducción con hormonas, agentes fisicoquímicos o agentes biológicos pueden incrementar significativamente la variabilidad genética, generando así, una fuente potencial de nuevos cultivares comerciales (Orbović *et al.*, 2008; Predieri, 2001).

En orquídeas, dada su importancia hortícola, se han desarrollado diversos métodos de propagación *in vitro*, tanto sexual, a través de semillas (Leroy y Pike, 1976; Arditti y Ernst, 1984; Sheehan, 1983.), como asexual con el cultivo de explantes vegetativos (Arditti, 1977; Sheehan, 1983; Sagawa y Kunisaki, 1984; Chin-Chi, 1986).

## 2.5 Citometría de flujo en orquídeas

La citometría de flujo es un método conveniente y rápido que ha sido ampliamente utilizado para la estimación del tamaño del genoma en plantas (Doležel *et al.*, 1998). En biotecnología vegetal, es una de las herramientas más utilizadas para analizar la estabilidad genética a través del nivel de ploidía de cultivos *in vitro* y de las plantas obtenidas.

Aunque solamente se ha investigado el tamaño del genoma de alrededor del 1% de la flora mundial (Bennett y Leitch, 1997), la correlación general de tamaño del genoma con el tamaño y duración del ciclo celular indica un papel fundamental del tamaño del genoma en muchos aspectos de la evolución de las plantas y su adaptación (Bennett, 1972, 1987; Price y Bachmann, 1976; Grime y Mowforth, 1982; Jasienski y Bazzaz, 1995). La cantidad de ADN que se encuentra en los núcleos de un organismo es el tamaño del genoma, y este se puede medir como picogramos (pg; i.e.,  $1 \times 10^{-9}$  g) o pares megabase (Mbp,  $1 \text{ pg} = 978 \text{ Mbp}$ ; Doležel *et al.*, 2003). El tamaño del genoma puede variar entre las especies aproximadamente hasta 800 veces (*Fritillaria assyriaca*,  $1C = 127.4 \text{ pg}$ , vs. *Arabidopsis thaliana*,  $1C = 0.165 \text{ pg}$  (Bennett y Smith, 1976; Bennett y Leitch, 1997). Sin embargo, las estimaciones de la misma especie son a veces muy diferentes (Bennett y Smith, 1976; Heslop-Harrison, 1991; Bennett y Leitch, 1995, 1997). La existencia y el alcance de esta variación intraespecífica en el tamaño del genoma, actualmente está recibiendo mucha atención (Greilhuber y Ebert, 1994; Bennett y Leitch, 1995; Baranyi y Greilhuber, 1996; Greilhuber y Obermayer, 1997).

El método alternativo a la citometría es el conteo cromosomático, a menudo, difícil de aplicar en el material leñoso debido al requerimiento de necesitar elevadas tasas de división mitótica. Por el contrario, la citometría de flujo no requiere células en división (Doležel, 1991). Muchos de estos estudios se enfocan en el efecto de las condiciones y edad de los cultivos en la estabilidad de la ploidía de las plantas obtenidas durante el proceso, de forma que se pueda certificar la adecuación del protocolo utilizado en la propagación a gran escala de los genotipos seleccionados (Bennetzen *et al.*, 2005).

En orquídeas no existe un procedimiento general, aunque ya se han descrito muchos protocolos para el aislamiento de núcleos (Galbraith *et al.*, 1983; Arumuganathan y Earle, 1991; Ulrich y Ulrich, 1991). La mayoría de estos protocolos utilizan tejidos jóvenes para evitar las altas concentraciones de almidones, polisacáridos, cristales de oxalato de calcio y otro tipo de metabolitos que se encuentran en tejidos viejos. La suspensión de núcleos obtenido de las orquídeas normalmente presenta altos niveles de cristales de oxalato de calcio, estos cristales bloquean el sistema de flujo del citómetro, para resolver este problema, es posible utilizar una columna de algodón y adicionar de polivinil pirrolidona-40 (PVP-40) al buffer para remover impurezas fenólicas y compuestos citoplásmicos del núcleo de las plantas, haciendo que la solución sea adecuada para el citómetro de flujo (Arumuganathan y Earle, 1991).

Este simple y eficiente método consigue el aislamiento de núcleos intactos del tejido vegetal de plantas que presentan altos niveles de polisacáridos, cristales de oxalato de calcio y otros metabolitos secundarios (Lee y Lin, 2005).

## **2.6 Requerimientos del cultivo de *Phalaenopsis***

En términos generales, las plantas se clasifican en dos categorías: plantas grandes, con densidad poblacional dentro del invernadero de 37 plantas.m<sup>-2</sup> y pequeñas con densidad de 63 plantas.m<sup>-2</sup> (Cuadro 1). Las plantas pequeñas requieren un periodo de cultivo 3 o 4 meses mayor que las grandes. Si las plantas pequeñas resultantes del proceso inicial de clasificación del cultivo se mantienen juntas, su crecimiento mejorará al poder someterlas a un mayor control y al liberarlas de la presión que les supone competir con plantas más grandes. Trasplantar las plantas pequeñas a semilleros retrasa su crecimiento y supone un trabajo añadido no recomendable (Anthura, 2007).

A su llegada, las plantas jóvenes deben desembalsarse y facilitar su aclimatación a las condiciones del vivero del cultivador. Una vez aclimatadas, después de algunas semanas, ya pueden cambiarse de macetas. Las plantas se colocan en posición vertical en macetas vacías y se rellena con sustrato. En el momento de trasplantarlas es importante comprobar que se colocan en posición vertical, en el centro de la maceta y a la altura correcta. Si se plantan a excesiva profundidad, su punto de crecimiento queda más expuesto al ataque de hongos; pero si se plantan demasiado cerca de la superficie, no podrá sostenerse correctamente y será inestable. Es importante no

presionar demasiado fuerte el punto de crecimiento al plantarlas en macetas, ya que podrían producirse deformaciones en las hojas o daños irreversibles en el punto de crecimiento (Wang, 1998).

Una vez trasplantadas, se escogen los ejemplares más pequeños y los de menor calidad y se colocan unos junto a otros. Los que cumplan con las características de la categoría superior serán separadas de las otras. El microclima y el crecimiento será mejor si el periodo en que las hojas tardan en entrar en contacto unas con otras es menor. Realizar la labor de espaciamiento en el momento adecuado es muy importante si quiere evitar un empobrecimiento de la forma de la planta con hojas pequeñas y alargadas. Se debe tener en cuenta que las plantas pequeñas que queden cubiertas por el follaje de las plantas circundantes, interrumpirán su crecimiento y, por tanto, los lotes de plantas resultantes serán menos uniformes (Chen y Wang, 1996; Anthura, 2007 y 2010).

El cultivo de *Phalaenopsis* se divide en tres fases: desarrollo, enfriamiento y terminación (Cuadro 1). Las plantas pasan de la fase de crecimiento a la fase de enfriamiento cuando 3 o 4 de sus hojas alcanzan los 20 cm de longitud como mínimo; es decir, cuando las plantas tienen el tamaño adecuado para promover la inducción floral uniforme durante el periodo de almacenamiento a bajas temperaturas. La fase de enfriamiento puede llevarse a cabo en cualquier época del año, siempre y cuando se alcance el descenso de temperatura necesario. Periodos cortos de enfriamiento conlleva a floración menos uniforme. Para la correcta floración es necesario un periodo de 5 o 6 semanas de frío con disminución de temperatura de 6 °C aproximadamente.

Las temperaturas bajas y la intensidad de luz elevada que la planta necesita para desarrollar los ramilletes de flores, a veces propician que el follaje adquiera un tinte rojizo. Cuando este tinte surge durante el periodo de enfriamiento no supone ningún problema, ya que seguidamente las plantas pasan a la siguiente fase: la terminación. En esta última fase las plantas se exponen a temperaturas ligeramente más suaves a fin de propiciar el desarrollo de la flor y que el follaje recupere su color original. Tanto la fase de enfriamiento como la de terminación pueden llevarse a cabo en el mismo sitio aunque económicamente, resulta más rentable llevar a cabo la fase de enfriamiento en una habitación más pequeña. Además, en una habitación especialmente dedicada a la fase de terminación es más fácil y rápido conseguir temperaturas ligeramente superiores durante periodos de 24 horas (Anthura, 2010).

**Cuadro 1.** Fases de desarrollo del cultivo de *Phalaenopsis* y espacio entre plantas

	<b>Fase</b>	<b>Operación</b>	<b>Tamaño de maceta</b>	<b>Plantas por m<sup>2</sup></b>	<b>Semanas</b>
<b>1<sup>a</sup></b>	Trasplante desde el envase	Trasplante	Caja/charola	344	20 - 30
<b>1<sup>a</sup></b>	Crecimiento	Trasplante	12 cm	63	22 – 27
<b>2<sup>a</sup></b>	Enfriamiento	Espaciamiento	12 cm	37	6
<b>3<sup>a</sup></b>	Terminación		12 cm	37	10 – 12

La duración total del cultivo en macetas de 12 cm es de 50 semanas (aproximadamente).

### **2.6.1 Sustrato**

El sustrato debe presentar partículas gruesas que faciliten el drenaje y partículas finas (no polvo) que faciliten la retención y distribución del agua y los nutrientes. No debe contener excesiva cantidad de polvo porque compactaría el sustrato que hay en el fondo de la maceta. La mezcla usada frecuentemente en los Países Bajos consiste en cortezas (12-16 mm) y 2-3 kg m<sup>-3</sup> de musgo. El uso de fibras de coco y gránulos también es frecuente. No obstante, las fibras de coco se resienten cuando la capa del sustrato se reseca demasiado; además, el soporte que se introduce en la maceta para sujetar las flores pierde estabilidad con este tipo de sustrato (Anthura, 2010).

Aparte del sustrato que se usa en la maceta, el drenaje es otro factor a considerar para que el agua de riego no permanezca demasiado tiempo en el fondo de la maceta. Es importante garantizar que el sustrato permanezca húmedo durante el primer mes y que la capa superior del sustrato no se reseque demasiado. Cuando durante las primeras semanas se producen fluctuaciones prolongadas del grado de humedad en el sustrato, será muy difícil corregir este error más adelante (Stubblings, 2006).

### **2.6.2 Sistema de riego**

*Phalaenopsis* requiere una fertilización rica en urea y se desarrolla en sustratos muy poroso, el agua debe suministrarse al cultivo mediante una red de tuberías de riego por aspersión o pulverizadores a presión. El agua no debe contener productos

químicos ni signos evidentes de contaminación. El nivel de sodio y cloro no debe superar los 50 mg L<sup>-1</sup> y el nivel de carbonatos tampoco puede ser elevado. A falta del suministro de agua de calidad se recomienda utilizar agua obtenida por ósmosis inversa. La cantidad que las plantas necesitan varía en función del clima, del sustrato y de la edad del cultivo. El sistema de riego debe estar preparado para suministrar entre 5 y 12 litros de agua m<sup>-2</sup> hora<sup>-1</sup> por día. Normalmente se utilizan macetas de 12 cm<sup>3</sup>, aunque *Phalaenopsis* pueden crecer tanto en bancales como en macetas. El método de cultivo a escoger dependerá de la velocidad de rotación, del grado de automatización de la operación y de la cantidad de mano de trabajo necesaria (Anthura, 2010).

Resulta importante garantizar que las plantas disponen del sistema de drenaje adecuado y que puede abastecerse el cultivo con el agua necesaria (Huang *et al.*, 1996).

### **2.6.3 Nutrición**

El cultivo de *Phalaenopsis* admite fertilizantes compuestos, así como fertilizantes con nitrato y amonio (Cuadro 2). Las necesidades pueden ser diferentes para cada una de las variedades. El nivel de pH puede oscilar entre 5.2 y 6.2. La conductividad eléctrica (CE) de la solución debe mantenerse entre 0.8 y 1.2 mS cm<sup>-1</sup>. Se debe evitar el uso excesivo de nitrógeno en forma de amonio y urea para que el follaje no resulte demasiado exuberante. Esta orquídea no necesita gran nivel de CO<sub>2</sub>, por lo que no precisan una provisión suplementaria (Anthura, 2007).

## Cuadro 2. Recomendaciones de fertilización para el desarrollo de *Phalaenopsis*.

---

**Sistema de tanque mezclador de 1000 litros de capacidad**

**Suministro de agua: 100 % de agua de lluvia**

**Solución A concentrada 100 veces**

---

<b>Nitrato de calcio</b>	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 19.0 % Ca, 15.5 % N	28.0 Kg
<b>Nitrato amonio</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 18 % N (9.0 % NO <sub>3</sub> y 9.0 % NH <sub>4</sub> )	23.0 Kg
<b>Quelato de hierro 3 %</b>	DTPA	3.0 Kg

---

**Solución B concentrada 100 veces**

---

<b>Nitrato de potasio</b>	KNO <sub>3</sub> 38.2 % K, 13.0 % N	20.0 kg
<b>Sulfato de potasio</b>	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 44.8 % K, 22.3 % P	21.0 kg
<b>Sulfato de magnesio</b>	MgSO <sub>4</sub> 9.9% Mg, 13.0 S	10.0 kg
<b>Sulfato de manganeso</b>	MnSO <sub>4</sub> 32.5 % Mn,	55 g
<b>Bórax</b>	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> 11.3 % B	100 g
<b>Sulfato de zinc</b>	ZnSO <sub>4</sub> 22.7 % Zn	55 g
<b>Sulfato de cobre</b>	CuSO <sub>4</sub> 25.5 % Cu	50 g
<b>Quelato de molibdeno</b>	DPTA	25 g
<b>Urea</b>	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	10.0 kg

---

### 2.6.4 Temperatura

*Phalaenopsis* es tropical y, por lo tanto, no tolera temperaturas inferiores a 15 °C ni superiores a 32 °C. Para obtener un crecimiento adecuado, durante esta fase debe mantenerse entre 26 y 27 °C y en la fase de terminación entre 19 y 21 °C. Durante la fase de enfriamiento la temperatura debe estar entre 18 y 20 °C. Mantener una temperatura de 18 °C es esencial sobre todo en los casos en los que la inducción de

flores se lleva a cabo bajo condiciones inadecuadas de luz o bajo temperaturas diurnas demasiado elevadas (Chen y Wang, 1996).

### **2.6.5 Intensidad luminosa**

Para obtener un buen desarrollo del follaje y raíces, el cultivo debe tener luz suficiente. Alta intensidad luminosa puede causar quemaduras en el follaje, pero si es insuficiente produce esparcimiento y empobrecimiento en la calidad de las plantas, escaso desarrollo de las raíces y ramilletes defectuosos. En días soleados, con radiación máxima de hasta  $1,400 \text{ Watt m}^{-2}$ , el cultivo necesitará un porcentaje de sombreado del 80-85 %, que puede conseguirse mediante el encalado del plástico y/o mallas sombra (Wang, 1998).

El cultivo en los países tropicales precisa una malla sombra que garantice un 85-90 % de protección. Se recomienda, preferentemente, el uso de dos mallas sombras, por ejemplo, una fija que proporcione el 65 % y una segunda móvil que proporcione el 25 % de protección. La malla móvil puede cerrarse en periodos de sequía y al mediodía a fin de evitar los periodos de mayor intensidad lumínica. Se recomienda el uso de pantallas de plástico cuando las plantas se cultivan en regiones muy lluviosas, ya que proporcionan mayor protección al cultivo y disminuyen la posibilidad de padecer enfermedades bacterianas y fúngicas. Otro beneficio es la reducción en la lixiviación de nutrientes del sustrato. Ello mantiene en estado óptimo la concentración de nutrientes en la maceta y, en consecuencia, garantiza el crecimiento rápido de las plantas. Se

recomienda emplear intensidades específicas de luz a nivel de las plantas para cada una de las fases (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Requerimientos de luz para *Phalaenopsis*.

<b>Requerimientos de luz</b>			
<b>Crecimiento</b>	5,000	8,000	lux
<b>Enfriamiento</b>	7,000	9,000	lux
<b>Terminación</b>	8,000	12,000	lux

En países con intensidad luminosa constante a lo largo del año, se permite añadir a estas cifras 20 % más de luz, siempre y cuando sea difusa. Debe tenerse en cuenta que, cuanto mayor sea la intensidad luminosa, mayor debe ser también la humedad relativa (Huang *et al.*, 1996).

### **2.6.6 Humedad relativa**

Aunque las plantas de *Phalaenopsis* están capacitadas para protegerse en casos de humedad relativa excesivamente baja, su crecimiento se verá favorecido si la humedad relativa es mayor. Sin embargo, un nivel de humedad relativa elevado junto con temperaturas elevadas, aumenta el riesgo de enfermedades bacterianas. La humedad relativa debe permanecer entre el 60 y el 80 %. Cuando es demasiado baja y la temperatura es elevada, se aconseja instalar sistemas que incrementen el grado de humedad, pero que no humedezcan el cultivo (por ejemplo, sistemas de alta presión en

las zonas superiores del invernadero, una red de tuberías de riego por aspersión debajo de las macetas, sistemas de ventilación, etc).

Elevadas temperaturas diurnas y altas intensidades de luz son válidas siempre y cuando el cultivo se lleve a cabo en países con humedad relativa elevada, para proporcionar temperaturas constantes y garantizar la correcta circulación de aire (Anthura, 2007).

Con el propósito de obtener un análisis exhaustivo de los posibles problemas de cualquier cultivo, se deben monitorear los parámetros climáticos más importantes, como la intensidad de la luz, la temperatura y la humedad relativa. Estas mediciones deben realizarse por medio de un ordenador climático o un medidor portátil y los datos registrados deben grabarse con los valores diarios máximos y mínimos (Lin, 1977).

### III. LITERATURA CITADA

**Akin-Idowu P., D. Ibitoye and O. Ademoyegun (2009)** Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. *African Journal of Biotechnology*. 8(16): 3782-3788.

**Anthura (2007)** Directrices para el cultivo de *Phalaenopsis* para flor cortada. Bureau IMAC Bleiswijk B.V. Países bajos.1-17.

**Anthura (2010)** Directrices para el cultivo de *Phalaenopsis* en maceta. Bureau IMAC Bleiswijk B.V. Países Bajos.1-12.

**Arditti J. (1977)** Clonal propagation of orchids by means of tissue culture a manual. *In: Orchid Biology Reviews and Prospectives*, Cornell University Press, Ithaca, pp. 203-293.

**Arditti J. and R. Ernst (1984)** Physiology of germinating orchid seeds. *In: Arditti J, ed. Orchid biology reviews and perspectives*, vol. III. Ithaca, NY, USA: Cornell University Press, 179–222.

**Arumuganathan K. and E. Earle (1991)** Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Molecular Biology Reporter* 9: 229–241.

**Baranyi M. and J. Greilhuber (1996)** Flow cytometric and Feulgen densitometric analysis of genome size in *Pisum*. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 297-307.

**Benderradji L., F. Brini, K. Kellou, N. Ykhelf, A. Djekoun, K. Masmoudi and H. Bouzerour (2012)** Callus induction, proliferation, and plantlets regeneration of two bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes under saline and heat stress conditions. ISRN Agronomy, Article ID 367851.

**Bennett M. (1972)** Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. Proceedings of the Royal Society of London B 181: 109-135.

**Bennett M. and J. Smith (1976)** Nuclear DNA amounts of angiosperms. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B274: 227-274.

**Benett, M. and I. Leitch (1995)** Nuclear DNA amounts in angiosperms. Annals of Botany. 76:113–176.

**Bennett M. and I. Leitch (1997)** Nuclear DNA amounts in angiosperms - 583 new estimates. Annals of Botany 80: 169-196.

**Bennetzen J., J. Ma and K. Devos (2005)** Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. Annals of Botany 95: 127–132.

**Betancourt-Olvera M., M. Rodríguez-Mendoza, M. Sandoval-Villa y E. Gaytán-Acuña (2005)** Fertilización foliar una herramienta en el desarrollo del cultivo de *Lilium* cv. Stargazer. Revista Chapingo Serie Horticultura 11(2): 371-378.

**Brown D. and T. Thorpe (1995)** Crop improvement through tissue culture. World Journal Microbiology & Biotechnology. 11: 409-415.

**Chandler S. and Y. Tanaka (2007)** Genetic modification in floriculture. Critical Reviews in Plant Sciences 26(4): 207-214.

**Chen W. and Y. Wang (1996)** *Phalaenopsis* orchid culture. Taiwan Sugar 43: 11–16.

**Chen W., C. Tang, T. Lin, Y. Wen and Y. Kao (2011)** Changes in the endopolyploid pattern of different tissues in diploid and tetraploid *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosa* (Orchidaceae). Plant Science. 181: 31-38.

**Chen W., M. Chyou, C. Wu, T. Chen and Y. Fu (1998)** Breeding *Phalaenopsis*. Experimental Report of the Taiwan Sugar Research Institute 1997/1998: 94–102.

**Chen Y., W. Chen, M. Chyou, Y. Fu, Y. Lin, T. Hsiau, K. Lin and L. Hong (1999)** Development of white Taisuco *Phalaenopsis*. In: Clark J, Elliott WM, Tingley G, Biro J (eds.), Proceedings of the 16<sup>th</sup> World Orchid Conference. Vancouver, Canada, pp. 272–278.

**Chin-Chi L. (1986)** *In vitro* Culture of Flower stalk internodes of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis*. Lyndleyana 1: 158-163.

**Doležel J. (1991)** Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochemical Analysis* 2: 143-154.

**Doležel J., J. Greilhuber, S. Lucretti, A. Meister, M. Lysak, L. Nardi and R. Obermayer (1998)** Plant genome size estimation by Flow Cytometry: Inter laboratory comparison. *Annals of Botany* 82 (A): 17-26.

**Doležel J., J. Bartoš, H. Voglmayr and J. Greilhuber (2003)** Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry A* 51A:127–1.

**Freed H. (1978)** The twelve most important white *Phalaenopsis* stud plants. *American Orchid Society Bulletin* 147: 1104-1111.

**Galbraith D., K. Harkins, J. Maddox, N. Ayres, D. Sharma and E. Firoozabady (1983)** Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220(4601): 1049-1051.

**Granada L. y J. Acuña (2010)** Perspectiva del sector productivo de ornamentales con relación a los derechos de obtentor en México. International seminar on plant breeder's rights. UPOV convention.

**Greilhuber J. and I. Ebert (1994)** Genome size variation in *Pisum sativum*. *Genome* 37: 646-655.

**Greilhuber J. and R. Obermayer (1997)** Genome size and maturity group in *Glycine max* (soybean). *Heredity* 78: 547-551.

**Griesbach R. (1981)** Colchicine-induced polyploidy in *Phalaenopsis* orchids, Department of Horticulture, Michigan State University, East Lansing, Michigan 48824, USA; *Plant Cell Tissue Organ Culture* 1: 103-107.

**Griesbach R. (2002)** Development of *Phalaenopsis* Orchids for the Mass-Market, Trends in new crops and new uses. ASHS Press, Reprinted from: Trends in new crops and new uses.

**Grime P. and M. Mowforth (1982)** Variation in genome size and ecological interpretation. *Nature* 299: 151-153.

**Hágsater E., M. Salazar, G. Jimenéz, y R. Machorro (2005)** Las orquídeas de México. México: Instituto Chinoin. México. Productos Farmacéuticos. 302 p.

**Heslop-Harrison J. (1991)** The molecular cytogenetics of plants. *Journal of Cell Science*. 09/1991; 100(1): 1-21.

**Huang T., C. Pan, M. Jean and C. Chen (1996)** Design and development of a greenhouse automatic environmental control system. Report of the Taiwan Sugar Research Institute 153: 53–74.

**Ichihashi T. (1996)** Effects of nutrition and potting media on growth and flowering of certain epiphytic orchids. Third World Orchid Conf. Proc. London, England.

**Jasienski M. and F. Bazzaz (1995)** Genome size and high CO. *Nature* 376: 559-560.

**Kindlmann T., T. Matsuno, M. Masuda and K. Gomi (2002)** Effects of concentration of nutrient solution and potting media on growth and chemical composition of *Phalaenopsis* hybrid. *J. Japan. Society Horticulture. Science.* 57: 78 – 84.

**Knudson L. (1946)** A new nutrient solution for germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin*, 15:214–217.

**La Croix I. (2000)** *Orchid Basics. A step-by-Step Guide to Growing and General Care.* New York: Sterling Publishing Co., Inc.

**Lee H. and T. Lin (2005)** Isolation of plant nuclei suitable for flow cytometry from recalcitrant tissue using a filtration column. *Plant Molecular Biology. Rep* 23: 53–58.

**Leroy T. and L. Pike (1976)** Flasking orchid seeds-A method for the novice grower. *American Orchid Society. Bulletin.* 45: 800-803.

**Leva A. and L. Rinaldi (2012)** Recent Advances In Plant In Vitro Culture. InTech Prepress, Novi Sad. 219 p.

**Lin T. (1977)** Native Orchids in Taiwan. Vol. 2. Chong Tao Company, Chiayi, Taiwan.

**MacLeod R. (1947)** Some effects of colchicine on orchids. American Orchid Society Bulletin. 16:336-337.

**Orbović V., M. Čalović, Z. Vilorja, B. Nielsen, F. Gmitter, W. Castle and J. Grosser (2008)** Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry. Euphytica 161: 329–335.

**Predieri S. (2001)** Mutation induction and tissue culture in improving fruits. Plant Cell Tissue and Organ Culture 64: 185–210.

**Price H. and K. Bachmann (1976)** Mitotic cycle time and DNA content in annual and perennial Microseridinae. Plant Systematics and Evolution 126: 323-330.

**Rotor G. (1958)** Colchicine as a tool in orchid hybridization. In: Proceedings 2<sup>nd</sup> World Orchid Conference. Rochester, England: Staples Printers Ltd, pp: 159-170.

**SAGARPA (2010)** Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Base de datos electrónica: [www.siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx). Consultada en Febrero 2015.

**Sagawa Y. and J. Kunisaki (1984)** Clonal Propagation: Orchids. Cell Culture and Somatic Cell. 3: 61-67.

**Sakhanokho H. and R. Kelley (2009)** Influence of salicylic acid on *in vitro* propagation and salt tolerance in *Hibiscus acetosella* and *Hibiscus moscheutos* (cv 'Luna Red') African Journal of Biotechnology 8: 1474–1481.

**Sheehan T. (1983)** Recent advances in botany, propagation, and physiology of orchids. Hort. Rev. 5: pp. 279- 315.

**So-Young K., E. Miyako, Y. Pil-Yong, and K. Akira (2010)** Production of intraspecific hybrids between wild-type and petaloid-sepal cultivars in *Habenaria radiata*. Scientia Horticulturae 124: 415-418.

**Stubbings J. (2006)** Development of white with colored lip *Phalaenopsis*. In: Hwang JH (ed.), Proceedings of Taiwan International Orchid Symposium, Taiwan Orchid Growers Association, Tainan, Taiwan, pp: 38–51.

**Takasaki S. (1989)** Recent *Phalaenopsis* breeding in the Hawaiian islands. American Orchid Society. Bulletin, 58(1): 8-15.

**Ulrich I. and W. Ulrich (1991)** High-resolution flow cytometry of nuclear DNA in higher plants. Protoplasma 165: 212–215.

**USDA (2010)** Classification for Kingdom Plantae Down to Species. Base de datos en línea del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Disponible en: <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=PHALA10>. Consulted in 2015.

**Vaughn L. and V. Vaughn (1973)** The ascendancy of white *Phalaenopsis*. American Orchid Society Bulletin, 42: 231-237.

**Vasquez G. and M. Frier (1991)** International taste in *Phalaenopsis* hybrids. American Orchid Society Bulletin, 60(1):10–14.

**Wang Y. (1998)** Deferring flowering of greenhouse-grown *Phalaenopsis* orchids by alternating dark and light. Department of horticultural sciences, Texas A&M University system agricultural research and extension center. Journal American Society Horticulture Science. 123(1): 56-60.



# Capítulo I



## Compatibilidad y obtención de híbridos intervarietales de *Phalaenopsis*

**\*Carlos Alberto Garibay Infante<sup>1</sup>, Martha Elena Pedraza Santos<sup>1</sup>, José López Medina<sup>1</sup>, Alejandro Martínez Palacios<sup>1</sup> y Nicolás Gutiérrez Rangel<sup>2</sup>** <sup>1</sup>Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. <sup>2</sup>Colegio de Postgraduados Campus Puebla, \*E-mail: togar-@hotmail.com (Autor responsable)

**Resumen.** El género *Phalaenopsis* representa uno de los grupos de orquídeas más apreciados por su amplia gama de colores y su larga vida de anaquel. A diferencia de otras especies de orquídeas, la forma de reproducción es un tanto difícil debido a que su crecimiento monopodial es muy lento lo que ha dificultado su propagación y se ha visto agravada en algunos híbridos por la presencia de altos niveles de esterilidad. Por lo anterior, para la determinación de compatibilidad en la obtención de híbridos intervarietales de *Phalaenopsis*, se realizaron cruzas entre ocho variedades comerciales, donde las variedades Dallas y Woodstock mostraron el mejor desempeño al ser usada como material parental masculino, por otra parte, la progenie donde la variedad Dallas fue utilizada como parte de su material genético mostró los mejores resultados en todas las variables agronómicas estudiadas. Por otra parte, los estudios de citometría de flujo indicaron que las variedades de *Phalaenopsis* evaluadas como parentales se obtuvieron cantidades de ADN nuclear entre los rangos de 1.911 a 2.251 pg, pero no hubo diferencias significativas entre ellas. Por, la fluorescencia relativa en los histogramas, se infiere que todas las variedades son diploides.

**Palabras Clave:** Cruzas, progenie y cantidades de ADN nuclear.

**Abstract.** The genus *Phalaenopsis* is one of the most prized orchids groups for its wide range of colors and its long shelf life. Unlike other species of orchids, the form of reproduction is very difficult because its monopodial growth is very slow wich has hampered its spread and has been aggravated in some hybrids by the presence of high levels of sterility. Therefore, to determine the compatibility for obtaining intraspecific hybrids of *Phalaenopsis*, crosses were made between 8 different commercial varieties, where the varieties Dallas and Woodstock showed the best performance when we used as male parental material, moreover, the progeny where the variety Dallas was used as part of its genetic material showed the best results in all agronomic variables studied, moreover, the flow cytometry studies showed that all the varieties of *Phalaenopsis* have ranges between 1.911 to 2.251 pg of nuclear DNA amounts, however they were not statistically meaningful, but thanks to the relative fluorescence histograms obtained we can infer that all varieties are diploids.

**Keywords:** Crosses, progeny and nuclear DNA amounts.

## I. INTRODUCCIÓN

Una de las estrategias más importantes para ser líder en la producción de ornamentales en el mundo, es el cultivo y desarrollo de nuevas variedades a través de la biotecnología, ya que la industria mundial se nutre de la novedad, por lo que durante muchos años se han buscado medios para ampliar el acervo genético de la floricultura y generar nuevas variedades comerciales. Este conocimiento se está aplicando en una amplia gama de especies ornamentales para generar modificaciones en la forma y el color de sus flores, también se basa en las capacidades de transformación de las plantas, que continúan su expansión a un ritmo acelerado (Clark *et al.*, 2004).

*Phalaenopsis* es una de las orquídeas comercialmente más importantes, con flores que son únicas y especializadas en forma y color. En México, la producción de orquídeas genera el mayor valor de la producción entre de las ornamentales, con \$ 4,533,000.00 . ha<sup>-1</sup>, seguido de las hortensias con \$ 3,150,000.00 y el ciclamen con \$ 2,990,000.00 (Granada y Acuña, 2010). A pesar de la alta rentabilidad que tienen las orquídeas, se les destina menos del 4 % de la superficie cultivada con ornamentales, y de ésta, la mayor parte es para *Phalaenopsis* (CONMEXFLOR, 2010; SAGARPA, 2010). Esto se debe a que 100 % del material vegetativo de orquídeas que se producen en México se importan de otros países, principalmente Holanda, y la inversión inicial para el establecimiento del cultivo es muy elevada. Además, las variedades que ingresan al país no son tan novedosas como las usadas en el mercado internacional.

Para obtener variedades de orquídeas mediante un programa de mejoramiento, es necesario contar con una amplia base genética que garantice suficiente variabilidad

para tener probabilidades de seleccionar genotipos valiosos (So-Young *et al.*, 2010). Esencialmente estos programas consisten en tres fases: generación de la variabilidad genética, selección de genotipos y evaluación de los genotipos seleccionados con caracteres agronómicos ideales (Novak y Brunner, 1992). Las variedades de *Phalaenopsis* utilizadas como material parental para su mejoramiento genético son usualmente divididas en dos grupos: el grupo estándar y el grupo de novedad, el primero se encuentra compuesto por plantas de flores grandes, usualmente blancas y rosas y el grupo de novedad son normalmente flores pequeñas o con colores especiales, algunas con fragancias (Chen *et al.*, 2000).

So-Young *et al.* (2010) determinaron la herencia genética del cultivar "Hishou", cruzándola con plantas criollas. Algunos híbridos intraespecíficos, que fueron confirmados por análisis de PCR-RFLP, tenían flores con un sépalo mediano petaloide y el labelo como sépalos laterales en el primer verticilo, indicando que se trataba de caracteres dominantes. Dado que el resto de los híbridos intraespecíficos tenía flores criollas, estos caracteres deben ser heterocigotos en plantas "Hishou". Aunque las plantas "Hishou" tenían flores no resupinadas, las flores de híbridos intraespecíficos eran resupinadas, aunque tenían el sépalo mediano petaloide y el labelo como sépalos laterales. Este resultado indica que la no resupinación debe ser un carácter recesivo. La sépalo-petalización y los caracteres de labelo triples de "Hishou" se heredan predominantemente, estos caracteres pueden ser utilizados para el mejoramiento de especies de *Habenaria* mediante cruza intra e interespecíficas.

Los materiales modernos de *Phalaenopsis* se desarrollaron a través de la hibridación de poblaciones reproductoras de diferentes fuentes, incluidas las granjas locales y muchos materiales de diferentes países como Japón, Países Bajos y los EE. UU. Basados en estos materiales, se desarrollaron híbridos grandes, bien formados, de flores blancas y con morfología uniforme (Chen *et al.*, 2004).

La hibridación intraespecífica para transmitir rasgos deseables a las variedades comerciales de *Phalaenopsis* es un proceso muy largo, que puede llevar años en ser alcanzado. Además, algunas especies resultan incompatibles al ser cruzadas y por ende, limitan el trabajo de mejoramiento de variedades. El conocer el tamaño del genoma es un dato importante en muchas áreas de la investigación vegetal, porque ahorra tiempo en el mejoramiento genético. Esta información puede ser obtenida mediante diferentes técnicas como la citometría de flujo que tiene aplicaciones directas en estudios moleculares, particularmente para un correcto planteamiento de bibliotecas genómicas (Fay *et al.*, 1991). Adicionalmente, este conocimiento permite la realización de estudios comparativos a gran escala, como por ejemplo, estudios de la variación del contenido en ADN a lo largo de la evolución de las plantas superiores (Leitch *et al.*, 2005). Finalmente, diversos estudios han evidenciado el carácter predictivo del tamaño del genoma en diversos caracteres fenotípicos, fenología, comportamiento ecológico, entre otros (Bennett *et al.*, 1998; Bennett y Leitch, 2005). El tamaño de genoma es un parámetro fundamental en muchos estudios genéticos y de biología molecular. El conocimiento del ADN nuclear es importante para estudios básicos y con aplicaciones en la organización del genoma, relación de especies, análisis de expresión de genes y mejoramiento del germoplasma (Bennett, 1986). Por ejemplo, una de las aplicaciones

directas es para la construcción de librerías de ADN (Clarke y Carbon, 1976; Frischauf, 1987). También es necesario para el desarrollo de mapas genéticos con fines de mejoramiento y a su vez poder estimar las distancias de recombinación de los genomas nucleares y correlacionar sus distancias genéticas con distancias físicas (Meagher *et al.*, 1988). Finalmente, esta información puede ser útil para evaluar la compatibilidad somática y reproductiva, importante para el mejoramiento de especies y para los programas de selección, especialmente para aquellos que utilizan cruza intraespecíficas (Baird *et al.*, 1994).

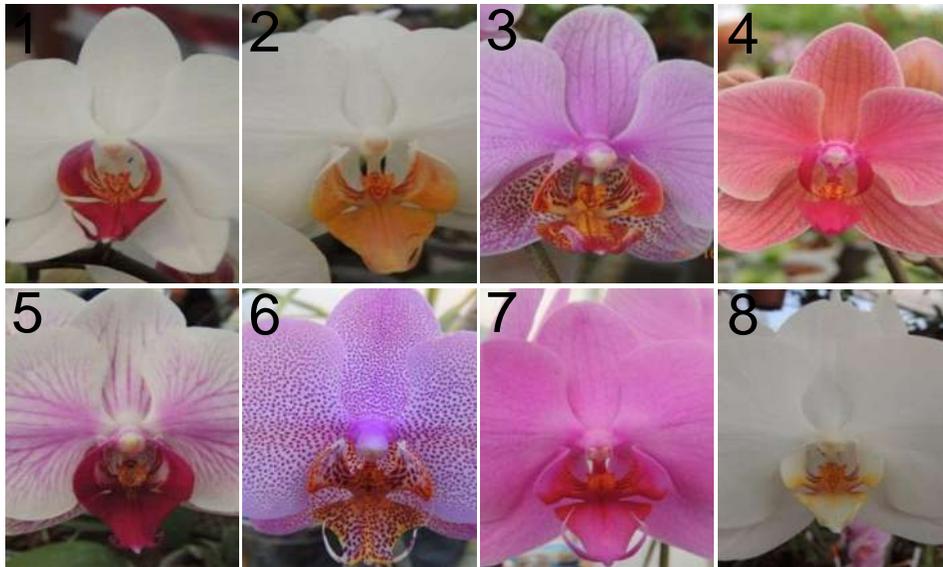
Por lo anterior, el utilizar nuevos enfoques y técnicas como el cultivo *in vitro* y la citometría de flujo ayudan con el objetivo de producir de forma más rápida y mejor nuevas variedades de *Phalaenopsis*, ya que aumenta la posibilidad de encontrar selecciones de interés (Santana *et al.*, 1996). En un sistema de mejoramiento *in vitro* se tiene la posibilidad de encontrar de 10 a 20 veces más variantes que en un sistema donde se produce variación somaclonal espontánea; sin embargo, las condiciones óptimas para el cultivo puede variar dependiendo de la especie (Gutiérrez *et al.*, 2003).

México a pesar de estar geográficamente bien ubicado para la comercialización de esta orquídea y tener las condiciones climáticas adecuadas, no cuenta con variedades propias. Por esto, el presente trabajo tiene como objetivo realizar cruza entre diversas variedades de *Phalaenopsis*, determinar cuál de éstas genera el mayor número de descendientes con características deseables, determinar qué cruza presentan incompatibilidad entre ellas y cuantificar el ADN nuclear de las variedades parentales.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Cruzas intervarietales de *Phalaenopsis*

Se efectuaron cruzas entre ocho diferentes variedades comerciales de *Phalaenopsis* (Figura 2). A los tres meses se registraron las cruzas viables y las cruzas que mostraron incompatibilidad.



**Figura 2.** Variedades de *Phalaenopsis* utilizadas para las cruzas. 1) Dublín, 2) Darwin, 3) Helena, 4) Ravena, 5) Dallas, 6) Manhattan, 7) Woodstock y 8) Katmandú.

Posteriormente se realizó una segunda etapa de polinización entre las diferentes variedades de *Phalaenopsis* (Figura 3) con el objetivo de validar los primeros resultados y poder descartar problemas de incompatibilidad por factores ambientales y/o mecánicos e identificar las posibles variedades que presentaron este problema. El éxito

de las cruzas se determinó a partir de la relación entre el número de cápsulas formadas y el número de flores que se fecundaron, los datos se expresaron en porcentaje (%).



**Figura 3.** Método de polinización en *Phalaenopsis*. 1) Extracción de polen de material parental, 2) Formación de cápsulas.

En las dos etapas de polinización el diseño experimental utilizado fue Totalmente al azar con tres o más repeticiones, para intentar obtener frutos. La unidad experimental consistió en una flor polinizada de *Phalaenopsis*. El porcentaje de formación de frutos se sometió a un análisis de varianza y prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) para las comparaciones de medias entre tratamientos (SAS, 2003; versión 9.0).

## 2.2 Obtención de plántulas mediante cultivo *in vitro*

Una vez concluidos los dos ciclos de cruzamientos, se cosecharon cápsulas de *Phalaenopsis* y las semillas obtenidas se cultivaron *in vitro* en frascos de vidrio de 100 mL que contenían 20 mL de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50% suplementado con tiamina ( $0.4 \text{ g L}^{-1}$ ), mio-inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), sacarosa ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) y agar ( $6 \text{ g L}^{-1}$ ). Después de la germinación, los protocormos obtenidos se subcultivaron en cajas magenta con 50 mL del medio MS (Figura 4).

Ciento cincuenta días después de la siembra (DDS) se registraron las variables más importantes como criterios de calidad para la selección de fenotipos superiores (Anthura, 2007 y 2010): peso fresco, número de plántulas, número de hojas y número de raíces.

Las plántulas obtenidas se aclimataron a condiciones de invernadero para observar si conservaron las características después de la regeneración.

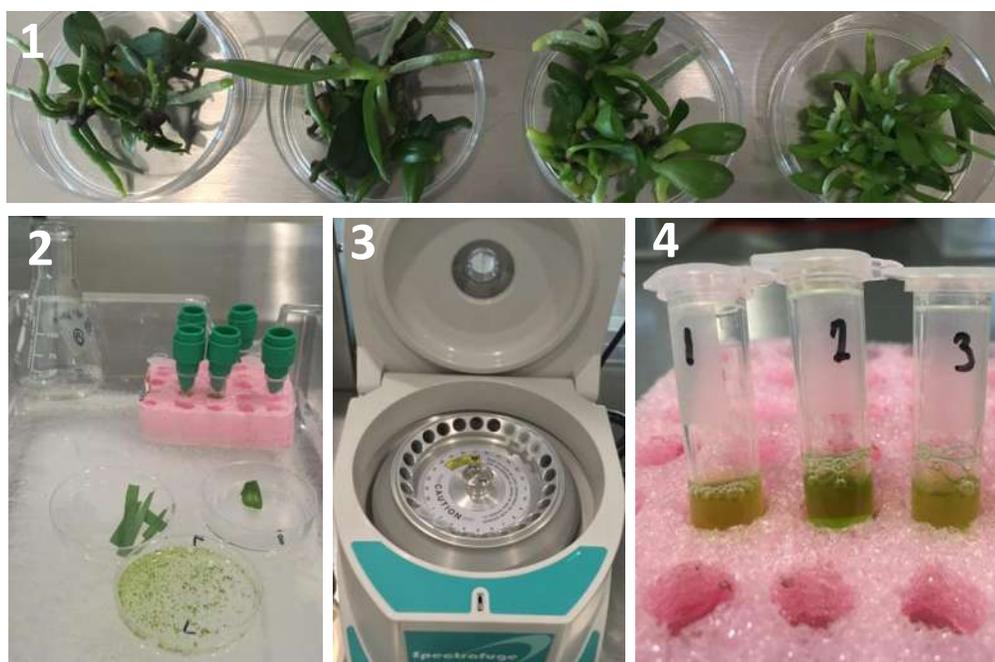


**Figura 4.** Cultivo *in vitro* de progenies de *Phalaenopsis*. 1) Plántulas generadas de las cruas, 2) Plántula de *Phalaenopsis* de cinco meses de edad, lista para medir variables agronómicas.

### 2.3 Medición del contenido de ADN nuclear mediante citometría de flujo

Para obtener más información de los materiales parentales se ajustó el protocolo planteado por Arumuganathan y Earle (1991), para verificar el tamaño de ADN nuclear mediante citometría de flujo y poder explicar la incompatibilidad que presentan algunas cruza de *Phalaenopsis*. Este proceso se efectuó en tres pasos: 1) liberación de los núcleos de las células vegetales, 2) tinción con yoduro de propidio y 3) medición de la fluorescencia con el citómetro de flujo.

Para liberar los núcleos de las células vegetales, se tomaron 100 mg de tejido fresco de plántulas de *Phalaenopsis* previamente cultivadas *in vitro*, se cortaron con una navaja en pequeñas piezas en una caja Petri con 150  $\mu$ L de solución buffer de  $MgSO_4$  (Preparación de 100 mL de solución Buffer  $MgSO_4$ : 10 mM  $MgSO_4$ , 50 mM KCl, 5 mM HEPES, 0.1% Triton X-100 y pH de 8.0; Van den Engh *et al.*, 1984). Posteriormente las muestras se filtraron a través de un filtro de nylon de 30  $\mu$ m de tamaño. La solución filtrada con los núcleos se colocó en una centrifuga a una velocidad de 12,000 revoluciones por minuto, una vez terminado el ciclo de centrifugado se desechó todo el sobrenadante de los tubos eppendorf dejando solamente el pellet, el cual posteriormente fue resuspendió en 500  $\mu$ L de solución buffer de  $MgSO_4$  adicionada con 5  $\mu$ L de RNAase, las muestras se colocaron durante 15 minutos en baño maría a 37 °C (Figura 5). Para teñir la solución se agregaron 10  $\mu$ L de yoduro de propidio (PI). La solución con los núcleos teñidos se mantuvo en oscuridad durante 30 minutos previos al análisis (Lin *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2011). Se realizaron tres repeticiones de cada uno de los materiales parentales de *Phalaenopsis*.



**Figura 5.** Proceso de extracción de ADN nuclear de *Phalaenopsis* para su análisis en citometría de flujo. 1) Plántulas de 5 meses de edad, 2) Cortado de los explantes para liberar el ADN de los núcleos, 3) Centrifugación de la solución y 4) Solución de ADN nuclear con yoduro de propidio.

La solución de núcleos fue analizada en un citómetro de flujo Attune® Acoustic Focusing Cytometer con luz azul/violeta equipado con un láser de iones de argón de 488 nm. Para poder validar una muestra esta tenía que contar con al menos 5000 a 10000 partículas contadas usando el citómetro de flujo. La media fue registrada en los histogramas.

Para estimar los valores de 2C de las *Phalaenopsis* se utilizó maíz (*Zea mays* L.) CIMMYT-“Población 21” con contenido de ADN de 4.75 pg/2C como estándar (Serrato *et al.*, 2000). Antes de cada análisis la muestra se ajustó para que el citómetro de flujo estuviera en los rangos de 50 a 1000. Los valores de la fluorescencia del ADN nuclear se estimaron con la fórmula siguiente (Arumuganathan y Earle, 1991):

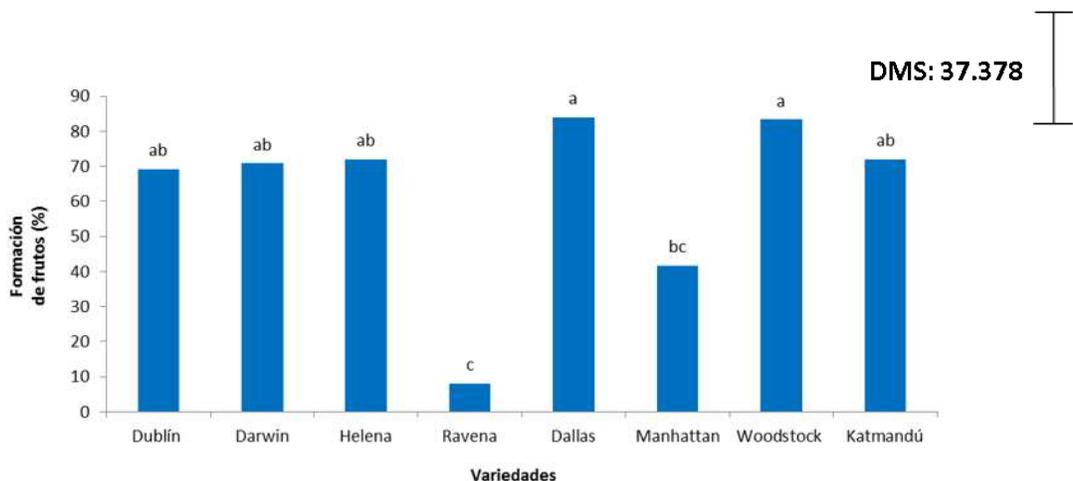
$$\text{Tasa de fluorescencia} = \frac{(\text{Media de la posición del pico nuclear de } Phalaenopsis \text{ en las fases } G_0/G_1)}{(\text{Media de la posición del pico nuclear del Mp21 en las fases } G_0/G_1)} \times 4.75$$

Los valores de las medias de las variedades parentales de *Phalaenopsis* se dividieron entre el valor de la media del estándar (Maiz pob 21) y posteriormente se multiplicaron por 4.75 pg (valor reportado por Serrato *et al.*, 2000) para poder estimar la cantidad de ADN nuclear.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Cruzas entre variedades de *Phalaenopsis*

Después de dos etapas de polinización no se encontraron diferencias estadísticas significativas en la formación de cápsulas entre las variedades cuando estas fungieron como progenitores femeninos; aunque sí se obtuvieron diferencias cuando se utilizaron como progenitores masculinos (Figura 6). Las variedades con mayores porcentajes de formación de frutos cuando se utilizaron como progenitores masculinos fueron Dallas (84 %) y Woodstock (83 %), estadísticamente superiores a Manhattan y Ravena, pero iguales con el resto. La variedad Ravena tuvo la menor proporción de formación de cápsulas (8 %) pero resultó estadísticamente igual a Manhattan (Figura 6). Bermúdez *et al.* (2015) en su trabajo observaron que la variedad Ravena al ser utilizada como progenitor masculino no formaba capsulas con las demás variedades y cuando ésta se utilizó como progenitor femenino las cápsulas formadas no generaron semillas.



**Figura 6.** Porcentaje de cápsulas formadas cuando las ocho variedades de *Phalaenopsis* fungieron como progenitores masculinos. Letras distintas en las barras indican diferencias significativas. DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05).

Las cruzas entre las variedades Manhattan con Helena no formaron cápsulas en ninguna de las dos etapas de polinización (Cuadro 4). En este sentido, Chuang *et al.* (2008), mencionan que en un sistema de cruzas intraespecíficas de *Phalaenopsis* comúnmente se presentan problemas de esterilidad, esto debido a que las variedades comerciales o híbridos tienen diferentes niveles de ploidía, pudiendo ser una de las principales causas de la esterilidad. Por otra parte, Griesbach (1985), indica que existen muchos factores que influyen en el éxito de la fecundación, uno muy importante es la condición del polen (salud, frescura, madurez, esterilidad) y el nivel de compatibilidad de la crusa. La condición del polen es extremadamente importante para determinar el éxito de la crusa, ya que el primer paso de la polinización es la unión del polen y el estigma, posteriormente el polen emerge para formar el tubo polínico para alcanzar el óvulo.

**Cuadro 4.** Relación de frutos formados entre número de intentos de polinización en cruzas de ocho variedades de *Phalaenopsis*

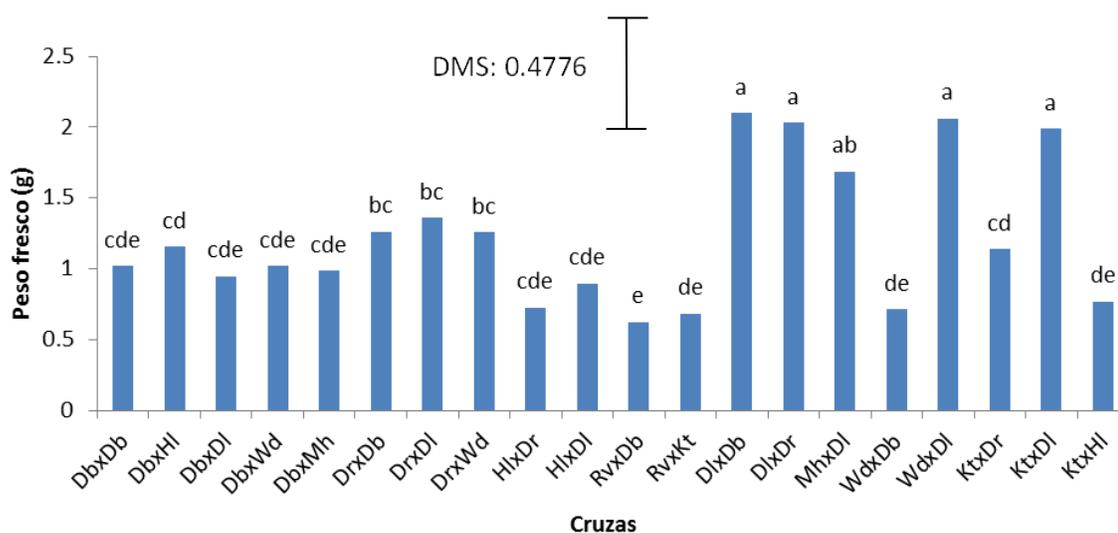
↓ ♀/♂ →	Dublín	Darwin	Helena	Ravena	Dallas	Manhattan	Woodstock	Katmandú
<b>Dublín</b>	(5/5)	(2/3)	(3/3)	(0/3)	(3/3)	(3/3)	(3/3)	(1/3)
<b>Darwin</b>	(2/3)	(2/3)	(2/3)	(1/3)	(3/3)	(2/3)	(3/3)	(2/3)
<b>Helena</b>	(2/3)	(2/3)	(3/3)	(0/4)	(3/3)	(0/3)	(3/3)	(2/3)
<b>Ravena</b>	(1/3)	(2/3)	(2/3)	(0/3)	(2/3)	(1/3)	(2/3)	(4/4)
<b>Dallas</b>	(3/3)	(3/3)	(2/3)	(0/3)	(2/4)	(0/3)	(2/3)	(3/3)
<b>Manhattan</b>	(2/3)	(2/3)	(0/3)	(1/3)	(3/3)	(0/3)	(2/3)	(2/3)
<b>Woodstock</b>	(3/3)	(2/3)	(2/3)	(0/3)	(2/3)	(2/3)	(3/3)	(2/3)
<b>Katmandú</b>	(1/3)	(2/3)	(4/4)	(0/3)	(3/3)	(2/3)	(2/3)	(2/3)

Asímismo Soeryowinoto y Soeryowinoto (1977), mencionan que los problemas de polinización en cruzas Intraespecíficas y cruzas intergenéricas de *Phalaenopsis* por lo general se encuentran con alguna anomalía en la meiosis, la baja fertilidad y esterilidad

del polen. Por su parte, Purwantoro *et al.* (2005), indican que con base en las características morfológicas de la flor, la compatibilidad de las cruzas se muestra por la capacidad del progenitor femenino para formar cápsulas. Wang (1963), clasificó la compatibilidad de las cruzas de la siguiente manera, se considera que una crusa es compatible si esta puede formar arriba del 20 % de cápsulas formadas, cuando el total de cápsulas formadas ronda entre el 10 y 20 % se considera que las cruzas son parcialmente compatibles y cuando el total de cápsulas formadas es menor al 10 % se considera que esas cruzas son incompatibles. Basados en la clasificación Wang, las cruzas intraespecíficas realizadas de *Phalaenopsis* en este estudio mostraron un alto índice de compatibilidad, ya que la variedad que mostró el menor porcentaje (50 %) fue Manhattan, y aun así, es un 30 % mayor a los porcentajes propuestos en su trabajo. Por otra parte, Bermúdez *et al.* (2015) determinaron la viabilidad de las semillas mediante la prueba de tretrazolio de los frutos de estas ocho variedades de *Phalaenopsis*. Sus resultados muestran que la crusa entre Darwin x Woodstock produjo la mayor cantidad de semillas con embrión (98.6 %) todas ellas viables y solo el 1.4 % de semillas sin embrión. La menor cantidad de semillas con embrión la obtuvieron de la crusa de Darwin x Darwin (69.6 %) de las cuales solo el 38.5 % eran viables. La crusa entre Katmandú x Dallas presentó la menor viabilidad con un 13.6 % de semillas viables. Estos resultados indican que el trabajo no termina con la obtención de frutos, hay mucho más que hacer, ya que existen variedades que pueden generar muchas semillas pero la mayoría de ellas no son viables como en el caso de Katmandú x Dallas, por lo que es importante seleccionar materiales parentales que produzcan progenies de calidad.

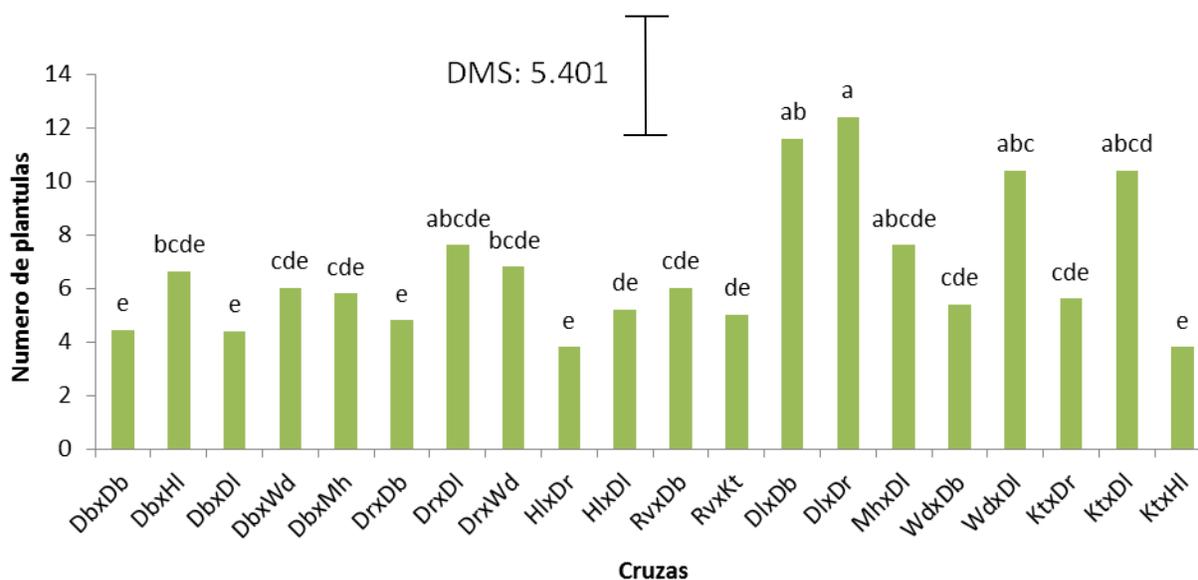
### 3.2 Calidad de las plántulas obtenidas mediante cultivo *in vitro*

En el peso fresco (g) destacaron cuatro progenies (con alrededor de 2 g) en las cuales la variedad Dallas siempre contribuyó con su material genético, ya sea como progenitor masculino o femenino (Figura 7). Al respecto, Nicola y Basoccu (1994) y Dufault (1998) mencionan que el obtener plántulas de calidad es uno de los factores más importantes, ya que pueden afectar la tasa de crecimiento posterior al trasplante. En este sentido, Sallaku *et al.* (2009) consideran que la distribución de productos fotosintéticos en hojas, tallos y raíces son los principales parámetros de calidad en plántulas de hortalizas, de tal manera que plántulas con mayor acumulación de materia en raíz y parte aérea, son de mejor calidad (Herrera *et al.*, 2008; Rosca, 2009). En general, plántulas de calidad resisten los efectos de patógenos y la incidencia de enfermedades (Elmer, 1997; Velasco, 1999).



**Figura 7.** Peso fresco de plántulas de *Phalaenopsis* obtenidas de las cruzas realizadas entre ocho variedades:Db) Dublín, Dr) Darwin, Hl) Helena, Rv) Ravena, Dl) Dallas, Mh) Manhattan, Wd) Woodstock y Kt) Katmandú. En las cruzas, el primer factor corresponde al progenitor ¿masculino? Letras distintas en las barras indican diferencias significativas. DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05).

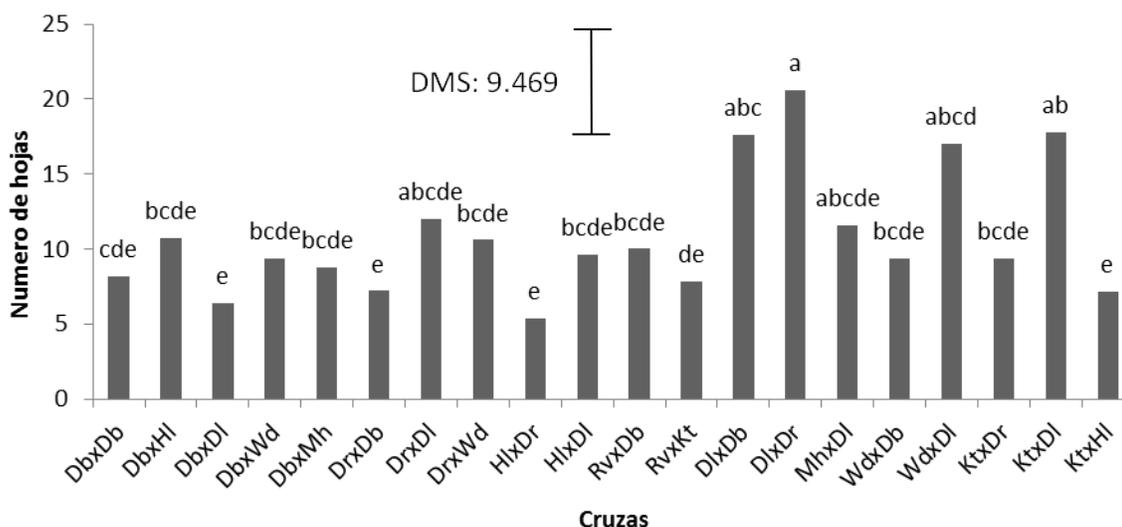
En el número de progenies obtenidas sobresalieron seis cruzas: Dallas x Darwin, Dallas x Dublín, Manhattan x Dallas, Woodstock x Dallas, Katmandú x Dallas y Darwin x Dallas; que generaron entre 7 y 12 plántulas aproximadamente). Como es muy claro de observar, en todas estas cruzas, también estuvo involucrada la variedad Dallas (Figura 8).



**Figura 8.** Número de plántulas obtenidas de las cruzas realizadas entre ocho variedades de *Phalaenopsis*. Db) Dublín, Dr) Darwin, Hl) Helena, Rv) Ravena, Dl) Dallas, Mh) Manhattan, Wd) Woodstock y Kt) Katmandú. En las cruzas, el primer factor corresponde al progenitor ¿masculino? Letras distintas en las barras indican diferencias significativas. DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05).

Para número de hojas, las cruzas Darwin x Dallas, Dallas x Dublin, Dallas x Darwin, Manhattan x Dallas, Woodstock x Dallas y Katmandú x Dallas; generaron el mayor número (entre 14 a 19 hojas) por unidad experimental. De igual forma que con las variables anteriores, el material Dallas, ya sea como material parental masculino o femenino se encuentra involucrado en todas las cruzas que generaron los mejores

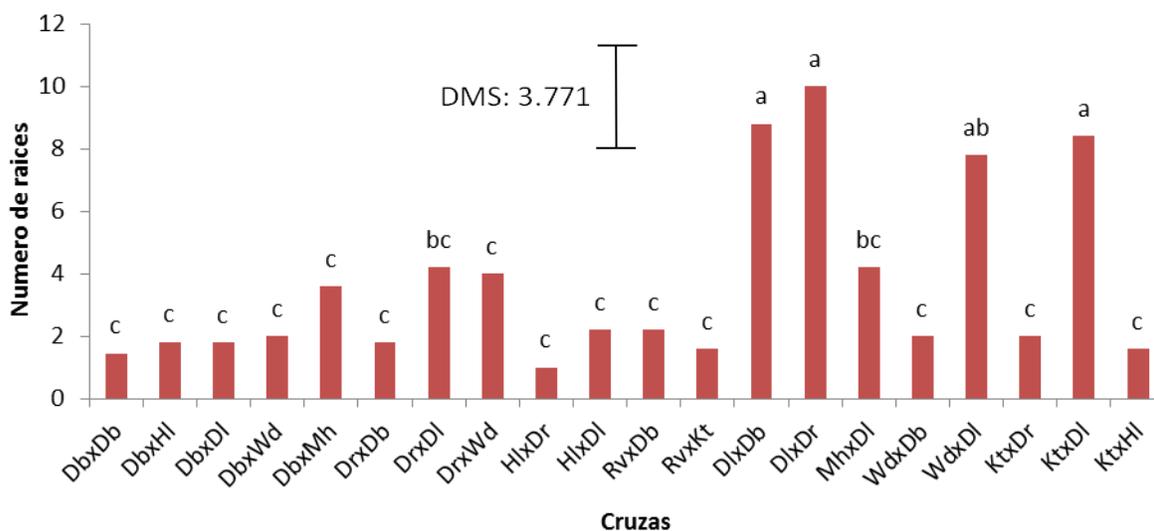
resultados (Figura 9). Sallaku *et al.* (2009) mencionan que el tener un número de hojas elevado, asegura una mayor producción de fotoasimilados y por lo tanto un gran índice de calidad para la producción de plántulas. Así mismo, Hernández *et al.* (2015) mencionan, en el caso del tabaco, que el rendimiento se encuentra determinado en gran medida por el número de hojas y el desarrollo que alcance la superficie foliar.



**Figura 9.** Número de hojas de plántulas de *Phalaenopsis* obtenidas de las cruzas entre ocho variedades: Db) Dublín, Dr) Darwin, Hl) Helena, Rv) Ravena, Dl) Dallas, Mh) Manhattan, Wd) Woodstock y Kt) Katmandú. En las cruzas, el primer factor corresponde al progenitor ¿masculino? Letras distintas en las barras indican diferencias significativas. DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05).

La progenie de las cruzas Dallas x Dublín, Dallas x Darwin, Woodstock x Dallas y Katmandú x Dallas, presentaron el mayor número de raíces (8 a 10 por frasco de vidrio de 100 mL), en este caso también la variedad Dallas se encontraba como parte del material genético ya sea como progenitor masculino o femenino (Figura 10). Al respecto, Quiroz *et al.* (2014) sembraron plántulas de *Acacia dealbata* en contenedores

de poliestireno expandido de volúmenes 24, 43, 56, 75, 80 y 100 cm<sup>3</sup>. Mencionan que los mayores crecimientos los obtuvieron en aquellas plantas con volumen radical de 100 cm<sup>3</sup>, y concluyen que las plántulas deben de presentar un sistema radicular sano y exuberante, ya que este ayuda a reducir pérdidas después del trasplante porque aumentan la absorción de agua y nutrientes. De igual forma, Barrera (2005), encontró en plantas de *Castanea sativa* Mill. producidas en contenedor de 1000 cm<sup>3</sup>, un crecimiento significativamente superior en comparación a volúmenes más pequeños (490 y 200 cm<sup>3</sup>) en las variables altura total, biomasa seca del tallo y biomasa seca de la raíz, menciona que el tener un sistema radicular vigoroso se genera mayor capacidad de supervivencia y altas tasas de crecimiento en condiciones climáticas severas.



**Figura 10.** Número de raíces de plántulas de *Phalaenopsis* por frasco de vidrio de 100 mL. obtenidas de la cruce de ocho variedades. Db) Dublín, Dr) Darwin, HI) Helena, Rv) Ravena, DI) Dallas, Mh) Manhattan, Wd) Woodstock y Kt) Katmandú. En las cruces, el primer factor corresponde al progenitor ¿masculino? Letras distintas en las barras indican diferencias significativas. DMS= Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05).

Los resultados del presente trabajo muestran la importancia que tienen las variables peso fresco, número de plántulas, número de hojas y número de raíces para la obtención de plántulas de calidad mediante cultivo *in vitro*. El tener buenos resultados en cualquiera de estos rubros representa a largo plazo un mejor desarrollo de plantas adultas y mayor supervivencia en condiciones biológicas adversas.

### **3.3 Medición del contenido de ADN nuclear mediante citometría de flujo**

Los valores obtenidos por el citómetro de flujo en las ocho variedades fueron de 1.911 a 2.251 picogramos. Los resultados no mostraron diferencias estadísticas significativas entre variedades pero se consideró importante indicar los valores obtenidos (Cuadro 5). Los coeficientes de variación entre 1.29 y 2.47 % se encontraron dentro de los rangos aceptables, ya que el coeficiente válido de variación de una muestra debe ser menor a 5 % (Doležel, 1991).

Los histogramas obtenidos por el citómetro de flujo no mostraron diferencias en el contenido de ADN nuclear entre variedades de *Phalaenopsis* pero sí entre ellas con respecto al control Maíz pob 21 (Figura 11). La variación en el tamaño del genoma entre especies relacionadas se le atribuye principalmente al contenido de heterocromatina (Flavell, 1982; Kubis *et al.*, 1998). Estudios previos muestran que nueve especies representativas de *Phalaenopsis* poseen el mismo número de cromosomas ( $2n=2x=38$ ) (Sagawa, 1962; Sagawa y Shoji, 1968), pero sus cariotipos difirieron marcadamente (Woodard, 1951; Shindo y Kamemoto, 1963). Al respecto, Lin

*et al.* (2001), encontraron que el contenido de heterocromatina constitutiva está positivamente correlacionado con el contenido de ADN nuclear. Kao *et al.* (2001) sugieren que la acumulación diferencial de heterocromatina constitutiva es una de las mayores causas para la variación entre cariotipos. Sus resultados de Genomic *in situ* hybridization, Fluorescence *in situ* hybridization, y Genomic Southern hybridization demostraron que las variedades de *Phalaenopsis* poseen diferentes cantidades de secuencias de ADN repetidas.

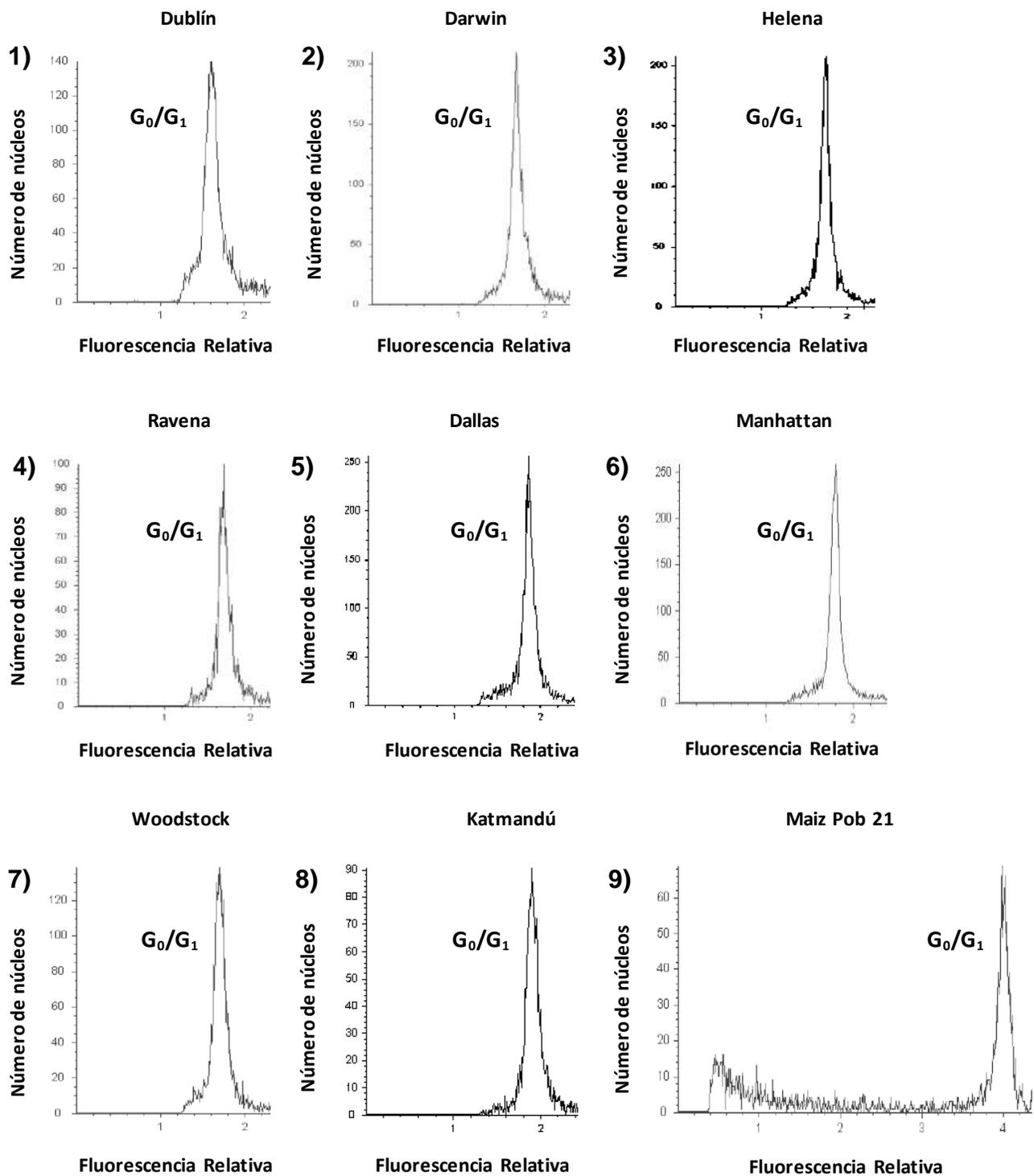
**Cuadro 5.** Contenido de ADN nuclear obtenidos mediante citometría de flujo, de ocho variedades parentales de *Phalaenopsis*.

<b>Variedad</b>	<b>ADN (pg)</b>	<b>Coefficiente de variación (%)</b>
<b>Dublín</b>	1.911	2.47
<b>Darwin</b>	1.992	1.60
<b>Helena</b>	2.076	1.66
<b>Ravena</b>	1.996	1.82
<b>Dallas</b>	2.215	1.66
<b>Manhattan</b>	2.126	1.29
<b>Woodstock</b>	2.013	2.32
<b>Katmandú</b>	2.251	1.70
<b>Maíz Pob 21</b>	4.75	0.71

En el presente trabajo, los histogramas obtenidos en el citómetro de flujo mostraron picos muy definidos, lo que significa que no se tuvo problemas con metabolitos secundarios como fenoles que son muy normales en esta especie o con impurezas.

También se puede observar que todas las variedades de *Phalaenopsis* utilizadas en el presente trabajo mostraron características similares en sus niveles de ADN nuclear. Las ocho variedades de *Phalaenopsis* presentaron fluorescencia relativa cercana a 2, a diferencia del control que mostró estar cercano a 4, estas muestras son representadas mediante el pico que se encuentra en la etapa G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> en la Figura 12. De manera similar, Lin *et al.* (2001) estimaron el contenido de ADN nuclear de 18 especies de *Phalaenopsis* Blume y *Doritis pulcherrima* Lindl. El contenido de ADN nuclear fue de 2.74 pg en *P. sanderiana* Rchb.f. hasta 16.61 pg en *P. parishii* Rchb.f. Sus resultados sugieren que el contenido de ADN nuclear medido por citometría de flujo de *Phalaenopsis* sp. está correlacionado con su número cromosómico, por ejemplo, confirmaron que el número cromosómico de los diferentes clones de *P. aphrodite* fueron  $2n=2x=38$  para W01-38;  $2n=3x=57$  para W01-41; y  $2n=4x=76$  para W01-22. El contenido nuclear de las muestras diploides, triploides y tetraploides de *P. aphrodite* tuvieron fluorescencia relativa cercana a 2:3:4, correspondiente a su número cromosómico, 38, 57 y 76. Es decir, la relación lineal entre el contenido nuclear de ADN y el número de cromosomas de estos tres clones confirmaron la precisión del citómetro de flujo. Meesawat *et al.* (2008) estimaron el contenido de ADN nuclear mediante citometría de flujo de plantas adultas cultivadas bajo condiciones de invernadero y plántulas *in vitro* de la orquídea *Dendrobium crumenatum* Sw. Los resultados de valores 2C obtenidos de las plantas adultas y de las cultivadas *in vitro* durante su primer ciclo de cultivo variaron en el rango 2.30 pg a 2.43 pg, con número cromosómico de  $2n=2x=38$  mostrando especies diploides. Sin embargo, los niveles de ploidia de hojas tomadas de plántulas cultivadas *in vitro* durante un segundo ciclo de cultivo mostraron individuos triploides ( $2n=3x=57$ ) y tetraploides ( $2n=4x=76$ ). Estos

niveles de ploidia se confirmaron mediante conteo de cromosomas. Los individuos triploides mostraron un contenido de ADN nuclear de 3.40 pg mientras que los individuos tetraploides tuvieron aproximadamente el doble de contenido de ADN nuclear (4.90 pg) que los diploides. Estas variantes pudieron ser resultado de cultivo prolongado en presencia de factores exógenos como reguladores de crecimiento.



**Figura 11.** Histogramas obtenidos en plántulas de ocho variedades de *Phalaenopsis* mediante el citómetro de flujo Attune® Acoustic. 1) Dublín, 2) Darwin, 3) Helena, 4) Ravena, 5) Dallas, 6) Manhattan, 7) Woodstock, 8) Katmandú y 9) Maíz CIMMYT-“Población 21” (Control). Los picos considerados corresponden a la fase  $G_0/G_1$  del ciclo celular.

López *et al.* (2014) analizaron un total de 64 accesiones de *Pfaffia glomerata* (ginseng brasileño) para determinar el contenido de ADN nuclear de sus especies diploides y su número cromosómico. En sus resultados, no se pudieron observar diferencias entre ninguna de las accesiones, los valores variaron de 2.37 a 2.60 pg con un CV de 2.2 %, con un número cromosómico de  $2n= 2x= 34$ . Una vez obtenidos estos resultados procedieron a añadir orizalina y colchicina para inducir poliploidia. Los tratamientos con orizalina no produjeron ningún efecto, mientras que los tratamientos expuestos a la colchicina produjeron muestras tetraploides con un contenido de ADN nuclear de 4.79 pg con un CV de 2.06 %.

Los trabajos propuestos por Lin *et al.* (2001), Kao *et al.* (2001), Meesawat *et al.* (2008); y López *et al.* (2014), muestran niveles de fluorescencia similares a los obtenidos en el presente trabajo y la relación que estos niveles muestran con la ploidia de las especies, esto indica que las ocho variedades de *Phalaenopsis* estudiadas en la presente investigación que presentaron niveles de fluorescencia relativa cercana a 2 son especies diploides ( $2n= 2x= 38$ ) tal como lo describen los trabajos previos propuestos por Sagawa (1962) y Sagawa y Shoji (1968) en las especies *P. amabilis* var. *grandiflora*, *P. schilleriana*, *P. lindenii*, *P. equestris*, *P. luddemanniana*, *P. luddemanniana* var. *ochracea*, *P. boxallii*, *P. mannii*, *P. violacea*, y *P. pulcherrima* (*Dorites pulcherrima*).

#### IV. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se concluye que las cruzas intervarietales de ocho variedades de *Phalaenopsis* tuvieron índices de compatibilidad mayores de 50 %, es decir, altos.

No hubo diferencias en el número de cápsulas formadas entre variedades, cuando éstas se utilizaron como progenitores femeninos; pero cuando se utilizaron como progenitores masculinos, destacaron las variedades Dallas y Woodstock.

La variedad Dallas utilizada como progenitor masculino o femenino se asoció con los mejores resultados en peso fresco, número de plántulas, número de hojas y número de raíces.

De acuerdo con el contenido de ADN nuclear entre las variedades de *Phalaenopsis* se infiere que todas son diploides y que la incompatibilidad observada entre las cruzas realizadas se atribuye a otros factores.

## V. LITERATURA CITADA

**Anthura (2007)** Directrices para el cultivo de *Phalaenopsis* para flor cortada. Bureau IMAC Bleiswijk B.V. Países bajos.1-17.

**Anthura (2010)** Directrices para el cultivo de *Phalaenopsis* en maceta. Bureau IMAC Bleiswijk B.V. Países bajos.1-12.

**Arumuganathan K. and E. Earle (1991)** Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. Department of Plant Breeding and Biometry, Cornell University, Ithaca. Plant Molecular Biology Reporter. 9(3): 229-233.

**Baird V., A. Estager and J. Wells (1994)** Estimating Nuclear DNA Content in Peach and Related Diploid Species Using Laser Flow Cytometry and DNA Hybridization. Journal of the American Society for Horticultural Science. 119(6): 1312 – 1316.

**Barrera P. (2005)** Efecto del tamaño del contenedor de polietileno sobre la calidad de plantas de Castaño (*Castanea sativa* MILL). Tesis (Ingeniero Forestal) - Universidad de Talca, Talca, Chile, 2005.

**Bennett M. (1986)** A developmental approach to training for intercultural sensitivity. International Journal of Intercultural Relations. 10(2): 179–196.

**Bennett M., I. Leitch and L. Hanson (1998)** DNA Amounts in Two Samples of Angiosperm Weeds. *Annals of Botany*. 82 (Supplement A): 121-134.

**Bennett M. and I. Leitch (2005)** Nuclear DNA Amounts in Angiosperms: Progress, Problems and Prospects. *Annals of Botany* 95: 45–90.

**Chen W., W. Tsai and M. Chyou (2000)** The breeding behavior of *Phalaenopsis equestris* (Schauer) Rchb.f. *Taiwan Sugar* 47(1):11-14.

**Chen W., T. Chen and W. Wu (2004)** The influence of *Phalaenopsis* Golden Peoker “Brother” on Harlequins. *Phalaenopsis J Int Phalaenopsis All*, Summer 2004:14-16.

**Chen W., C. Tang, T. Lin, Y. Wen and Y. Kao (2011)** Changes in the endopolyploid pattern of different tissues in diploid and tetraploid *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosa* (Orchidaceae). *Plant Science*. 181: 31-38.

**Chuang H., S. Hsu and T. Shen (2008)** Breeding barriers in yellow *Phalaenopsis* orchids. *J. Taiwan Society. Horticulture. Science*. 54: 59–66.

**Clark D., P. Christou and H. Klee (2004)** Applications of plant biotechnology to ornamental crops. *Handbook of plant biotechnology, vol 2: Applications of Plant Biotechnology in Agriculture, the Pharmaceutical Industry, other industries*. Wiley, London, pp 863 – 879.

**Clarke L. and J. Carbon (1976)** A colony bank containing synthetic Col EI hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. Elsevier. Cell. 9(1): 91 -99.

**CONMEXFLOR (2010)** Consejo Mexicano de la Flor. Base de datos electrónica: <http://www.conmexflor.org>. Consultada en el año 2015.

**Doležel J. (1991)** Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. Phytochemical Analysis 2: 143-154.

**Dufault R. (1998)** Vegetable transplant nutrition. Horticulture Technology 8: 515–523.

**Elmer W. (1997)** Influence of chloride and nitrogen form on *Rhizoctonia* rot and crown rot of table beets. Plant Disease Journal. 81: 635–640.

**Fay S., R. Posner, W. Swann and L. Skالر (1991)** Real-time analysis of the assembly of ligand, receptor, and G protein by quantitative fluorescence flow cytometry. Biochemistry, 30 (20), pp 5066–5075.

**Flavell R. (1982)** Sequence amplification, deletion and rearrangement: Major sources of variation during species divergence. In: Dover FA, Flavell RB (eds.), *Genome Evolution*. Academic Press, London, pp. 301–323.

**Granada L. y J. Acuña (2010)** Perspectiva del sector productivo de ornamentales con relación a los derechos de obtentor en México. International seminar on plant breeder's rights. UPOV convention.

**Griesbach R. (1985)** Polyploidy in *Phalaenopsis* orchid improvement. Heredity. 76, 74–75.

**Gutiérrez M., F. Santacruz, J. Cabrera y B. Rodríguez (2003)** Mejoramiento genético vegetal *in vitro*. e-Gnosis. Vol. 1. Art. 4.

**Hernández J., Y. González y B. Hernández (2015)** Espaciado entre plantas y número de hojas en el tabaco negro tapado. I. Efecto en el crecimiento y desarrollo. Cultivos Tropicales 36: 116-121.

**Herrera F., J. Castillo, A. Chica and L. López (2008)** Use of municipal solid waste compost (MSWC) as a growing medium in the nursery production of tomato plants. Bioresource Technology 99: 287–296.

**Kao Y., S. Chang, T. Lin , C. Hsieh, Y. Chen, W. Chen and C. Chen (2001)** Differential accumulation of heterochromatin as a cause for karyotype variation in *Phalaenopsis* orchids. Annals of Botany 87: 387–395.

**Kubis S., T. Schmidt and J. Heslop-Harrison (1998)** Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes. Annals of Botany. 82 (Suppl. A): 45–55.

**Leitch I., D. Soltis, P. Soltis and M. Bennett (2005)** Evolution of DNA amounts across land plants (Embryophyta). *Annals of Botany*. 95(1): 207 – 217.

**Lin S., H. Lee, W. Chen, C. Chen, Y. Kao, Y. Fu, Y. Chen and T. Lin (2001)** Nuclear DNA contents of *Phalaenopsis* sp. and *Doritis pulcherrima* *Journal American Society. Horticultural. Science* 126: 195 – 199.

**Lopes S., C. Witt, C. Siqueira, M. Trevizani, N. Barbosa, M. Morato, M. Santos, J. Salabert, W. Campos y L. Viccini (2014)** Karyotype, genome size, and *in vitro* chromosome doubling of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 118: 45–56.

**Meagher R., M. McLean and J. Arnold (1988)** Recombination Within a Subclass of Restriction Fragment Length Polymorphisms May Help Link Classical and Molecular Genetics *Genetics Society of America*. 120: 809 - 818.

**Meesawat U., T. Srisawat, L. Eksomtramage and K. Kanchanapoom (2008)** Nuclear DNA content of the pigeon orchid (*Dendrobium crumenatum* Sw.) with the analysis of flow cytometry. *Songklanakarin Journal Science* 30(3): 277-280.

**Meng R. and C. Finn (2002)** Determining ploidy level and nuclear DNA content in *Rubus* by flow cytometry. *Journal American Society. Horticultural. Science* 127(5): 767-775.

**Murashige T. and F. Skoog (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

**Nicola S. and L. Bassocu (1994)** Pretransplant nutritional conditioning affects pepper seedling growth and yield. *Acta Horticulturae* 361: 519–526.

**Novak F. and H. Brunner (1992)** Tecnología de mutación inducida para el mejoramiento de los cultivos. *BOLETÍN DEL OIEA*.

**Purwanto A., E. Ambarwati and F. Setyaningsih (2005)** Kekerabatan antar anggrek spesies berdasarkan sifat morfologi tanaman dan bunga. *Jurnal Ilmu Pertanian* 12(1): 1-11.

**Quiroz I., M. Pincheira, J. Hernandez, M. Gonzalez, E. Garcia y H. Soto (2014)** Efecto del volumen radicular sobre el crecimiento de *Acacia dealbata* Link. en vivero y en terreno en el secano de la Región del Biobío, Chile. *Revista Árvore*. 38(1): 155-164.

**Rosca V. (2009)** Optimization of nitrogen concentration in the fertilization solution for production of seedlings in cell trays. *Acta Horticulturae*. 807: 613–618.

**SAGARPA (2010)** Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Base de datos electrónica: [www.siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx). Consultada en el año 2015.

**Sagawa Y. (1962)** Cytological studies of the genus *Phalaenopsis*. American Orchid Society Bulletin 31: 459–465.

**Sagawa Y. and T. Shoji (1968)** Chromosome numbers in *Phalaenopsis* and *Doritis*. Pacific Orchid Society Bulletin. 26: 9–13.

**Sallaku G., A. Bani and A. Balliu (2009)** The effects of N concentration in pretransplant nutrient solution on the N use efficiency and dry mass partitioning of vegetable solanaceae seedlings. Acta Horticulturae. 830: 405-412.

**Santana I., O. Nodarse y A. Arencibia (1996)** Utilización del  $\alpha$ -bromonaftaleno en la inducción de mutaciones en cultivo de tejidos de caña de azúcar. [sian.inia.gob.ve](http://sian.inia.gob.ve).

**Serrato M., M. Hernández, Y. Savidan, y N. Bárcenas (2000)** Contenido de ADN y nivel de ploidía en *Tagetes* spp. Utilizando citómetro de flujo. Agrociencia 34(6): 729-734.

**Shindo K. and H. Kamemoto (1963)** Karyotype analysis of some species of *Phalaenopsis*. Cytologia 28: 390–398.

**Soeryowinoto S. y M. Soeryowinoto (1977)** Perbanyakan vegetatif pada anggrek. Kanisius. Yogyakarta.

**So-Young K., E. Miyako, Y. Pil-Yong and K. Akira (2010)** Production of intraspecific hybrids between wild-type and petaloid-sepal cultivars in *Habenaria radiata*. *Scientia Horticulturae* 124: 415-418.

**Van den Engh G., B. Trask, S. Cram and M. Bartholdi (1984)** Preparation of Chromosome Suspensions for Flow Cytometry. *Cytometry* 5:108-117.

**Velasco V. (1999)** Papel de la nutrición mineral en la tolerancia a las enfermedades de las plantas. *Terra Latinoamericana* 3: 193–200.

**Wang H. (1963)** A study on the self and cross incompatibility in the sweet potato in Taiwan. *American Society Horticultural. Science.* 84: 424-430.

**Woodard J. (1951)** Some chromosome numbers in *Phalaenopsis*. *American Orchid Society Bulletin* 20: 356–358.



# Capítulo II



# Regeneración *in vitro* de *Phalaenopsis* sp. a partir de explantes de hojas

**\*Carlos Alberto Garibay Infante<sup>1</sup>, Martha Elena Pedraza Santos<sup>1</sup>, José López Medina<sup>1</sup>, Alejandro Martínez Palacios<sup>1</sup> y Nicolás Gutiérrez Rangel<sup>2</sup>** <sup>1</sup>Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. <sup>2</sup>Colegio de Postgraduados Campus Puebla, \*E-mail: togar-@hotmail.com (Autor responsable).

**Resumen.** *Phalaenopsis* es el género más conocido de la familia de las orquídeas. A pesar de la alta rentabilidad que demuestra su cultivo, todas las variedades producidas en México se importan del extranjero. Por lo anterior es importante establecer sistemas de propagación vegetativa que nos ayude a reducir costos de producción y también a activar el mercado florícola nacional. Para cumplir con este objetivo, la investigación se dividió en tres experimentos en los que se utilizaron dos tipos de hormonas (ANA y BA) en diferentes concentraciones. El resultado más satisfactorio del primer experimento se encontró con la concentración de 1 mg L<sup>-1</sup> de ANA y 10 mg L<sup>-1</sup> de BA con un 85 % de formación de brotes vía organogénesis directa. En el segundo experimento los tratamientos que presentaron resultados con diferencias significativas fueron los que contenían 10 mg L<sup>-1</sup> de BA. En el tercer experimento los explantes expuestos a una concentración de 10 mg L<sup>-1</sup> de BA fueron los que tuvieron mayor respuesta morfogénica y los explantes expuestos a la concentración de 6mg L<sup>-1</sup> de BA fueron los que generaron mayor número de brotes y presentaron los mejores resultados en las variables altura y ancho de brotes. Con estos resultados fue posible la regeneración *in vitro* de *Phalaenopsis*.

**Palabras Clave:** Propagación vegetativa, hormonas y organogénesis directa.

**Abstract.** *Phalaenopsis* is best known genus of the orchid family. Despite the high profitability that this crop demonstrates, all the varieties that are produced in México are imported from abroad. Therefore it is very important to establish a vegetative propagation protocol to help us to reduce production costs and also enable the national floriculture market, to accomplish this objective; the research was divided into two experiments where they were used two different types of hormones (ANA and BA) in different concentrations. The successful outcome of the first experiment was accomplish with the concentration of 1 mg L<sup>-1</sup> ANA and 10 mg L<sup>-1</sup> BA with 85% of shoot formation via direct organogenesis. In the second experiment the treatments that presented results with significant differences were containing 10 mg L<sup>-1</sup> BA. In the third experiment the explants expose to a concentration of 10 mg L<sup>-1</sup> of BA have better morphogenic response and the explants that were expose to a concentration of 6 mg L<sup>-1</sup> of BA generate a higher number of shoots and they present better outcome in the variables height and width of shoots .With this results it was possible the vegetative regeneration of *Phalaenopsis*.

**Keywords:** Vegetative propagation, hormones and direct organogenesis.

## I. INTRODUCCIÓN

Los híbridos comerciales de *Phalaenopsis* tienen un alto valor en el mercado internacional tanto para flores de corte como para flores en maceta. Estas plantas poseen numerosos atributos comerciales que incluyen arquitectura exótica y estilizada, flores con gran variedad de colores, patrones y vida de florero mayor a ocho semanas (Runkle, 2007).

La propagación vegetativa de *Phalaenopsis* a partir de división de plantas es un proceso lento, por esto es común el uso de técnicas de cultivo *in vitro* para la germinación asimbiótica de las semillas. Con este método es posible obtener miles de plántulas a partir de un fruto maduro (Griesbach, 2002). Sin embargo, la variabilidad de estas plántulas se expresan durante su cultivo en invernadero.

Para la producción comercial de plantas terminadas de alta calidad se requiere encontrar alternativas al sistema de propagación por semilla. Generar un método de propagación clonal tendría como principales ventajas producir plantas jóvenes de características fenotípicas uniformes y libres de patógenos, incluidos los virus (Runkle, 2007). Además, es posible acortar ciclos reproductivos para acelerar procesos de cruzamiento y conservar genotipos superiores que determinen características genéticas favorables.

Existen algunas investigaciones que muestran avances sobresalientes para la obtención de protocormos o brotes adventicios a partir de hojas obtenidas de escapos

florales (Tanaka y Sakanishi, 1985; Tanaka, 1992). Los protocormos son estructuras únicas de las orquídeas incluyendo a *Phalaenopsis*, que se forman durante el desarrollo temprano de los embriones (Ishii *et al.*, 1998). La proliferación de protocormos o de cuerpos como protocormos (PLBs) normalmente significa un incremento en el número de orquídeas reproducidas.

En un esfuerzo por obtener mayor número de brotes o formación de protocormos, los propagadores han utilizado medios enriquecidos con distintos niveles de hormonas (Arditti, 1977). Con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y thidiazuron (TDZ) adicionado en medio líquido o sólido es posible acelerar la tasa de crecimiento, pero también generar mutaciones no deseables (Vajrabhaya, 1997). Estos efectos secundarios poco deseables pueden ser reducidos o eliminados utilizando un medio sin fitohormonas o con concentraciones bajas de éstos (Gu *et al.*, 1987), pero adicionado con productos como agua de coco y homogenizado de plátano, entre otros (Yam *et al.*, 1991).

Para inducir embriogénesis somática directa, se han usado segmentos de hoja cultivados en el medio MS al 50 % con 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), kinetina (Kin), N6-benciladenina (BA) y tidiazuron (TDZ) (Kuo *et al.*, 2005). Como fuente de carbono Islam *et al.* (1998), observaron que los medios adicionados con sorbitol o sacarosa mejoraron el desarrollo *in vitro* de *Phalaenopsis*.

Tanaka y Sakanishi (1985), señalan que es posible la regeneración de protocormos a partir de segmentos de hojas jóvenes no expandidas de *Phalaenopsis* maduras colocados en medio MS con 1 mg L<sup>-1</sup> de NAA, 10 mg L<sup>-1</sup> de adenina y 10 mg L<sup>-1</sup> de BA.

So-Young *et al.* (2002), regeneraron *Phalaenopsis* de secciones de hoja de cuatro cultivares en medio MS suplementado con BA (88.8  $\mu\text{M}$ ) y NAA (5.4  $\mu\text{M}$ ); en promedio la producción fue de 10 a 13 protocormos después de 12 semanas. Los PLB's lograron un desarrollo adecuado en un medio modificado de Hyponex (1  $\text{gl}^{-1}$  de la formula, 6.5N – 4.5P – 19K + 1  $\text{gl}^{-1}$  de la formula 20N – 20P – 20K + 2  $\text{gl}^{-1}$  peptona + 3 % (p/v) homogenizado de papa + 0.05% de carbón activado).

Sin embargo, el cultivo *in vitro* utilizando secciones de hoja en *Phalaenopsis* aún se encuentra con problemas como la exudación de fenoles, necrosis de los explantes y variación somaclonal, entre otros (Chugh *et al.*, 2009).

Por lo anterior, la presente investigación tiene como objetivo establecer un protocolo para la regeneración *in vitro* de *Phalaenopsis* vía organogénesis directa, a partir de secciones de hoja.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

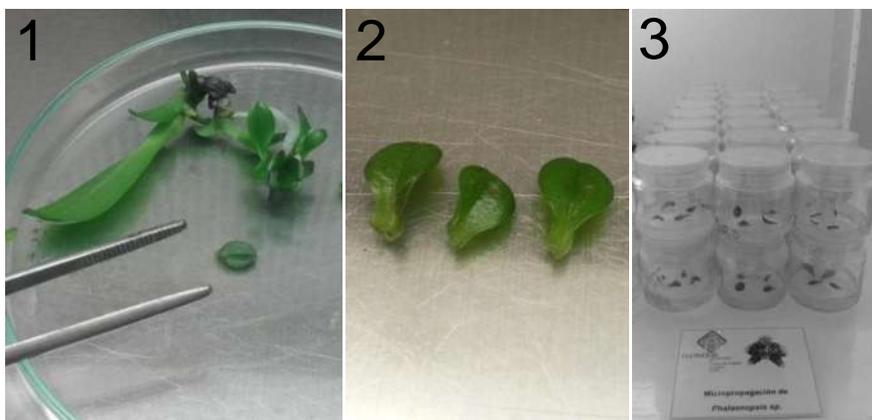
Se tomaron hojas de plántulas de *Phalaenopsis* previamente cultivadas *in vitro*, se cortaron en secciones de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> (Figura 12) y se colocaron en frascos de vidrio de 100 mL<sup>-1</sup> de capacidad con 20 mL<sup>-1</sup> del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962) a 50 % de su concentración, adicionado coniamina (4 mg L<sup>-1</sup>), mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>) y agar (6 g L<sup>-1</sup>), el pH de las soluciones se ajustó a 5.7 ± 0.1.

En un primer experimento, los explantes se sometieron a 15 tratamientos formados por tres concentraciones de α-ácido naftalenacético (ANA) (0, 1 y 5 mg L<sup>-1</sup>) combinadas con cuatro de benciladenina (BA) (0, 2.5, 5.0, 10 y 20 mg L<sup>-1</sup>).



**Figura 12.** Establecimiento del cultivo *in vitro* de *Phalaenopsis* a partir de secciones de hoja. 1) Plántulas de *Phalaenopsis* de 6 meses de edad, 2) hojas seccionadas, 3) secciones de hoja colocadas en frascos para su regeneración.

Se estableció un segundo experimento con hojas completas de plántulas de aproximadamente 5 meses cultivadas *in vitro* y se colocaron en el medio MS descrito anteriormente, más 20 mg L<sup>-1</sup> de cisteína. Tomando como base el mejor tratamiento del ensayo anterior (1 mg L<sup>-1</sup> de ANA más 10 mg L<sup>-1</sup> de BA), se probaron 16 tratamientos constituidos por cuatro concentraciones de ANA (0, 0.5, 1 y 2 mg L<sup>-1</sup>) combinadas con cuatro de BA (0, 10, 15 y 20 mg L<sup>-1</sup>).



**Figura 13.** Establecimiento del cultivos *in vitro* de *Phalaenopsis* a partir de hojas de plántulas. 1) Selección de hojas de *Phalaenopsis*, 2) hojas separadas y listas para ser establecidas, 3) experimento establecido en la cámara de crecimiento.

Para un tercer experimento se tomaron hojas completas de plántulas de *Phalaenopsis* de 5 meses de cultivo *in vitro*. Los explantes se sometieron a 14 tratamientos conformados por la combinación de siete concentraciones de benciladenina (0, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 mg L<sup>-1</sup>) y dos tipos de medio de cultivo: medio MS normal y MS modificado compuesto por NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 2.5 mM, KNO<sub>3</sub> 1.25 mM, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 1.50 mM, Ca(NO<sub>3</sub>) 4

H<sub>2</sub>O 6.0 mM, EDTA 0.10 mM, Fe 0.09 mM, MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O 5.00 μM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 100 μM, ZnSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O 30 μM, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O 1.0 μM, CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 0.1 μM (Raya *et al.*, 2009).

En los tres ensayos, el diseño experimental fue completamente al azar con arreglo de tratamientos factorial con cinco repeticiones, cada unidad experimental consistió en un frasco de 100 mL<sup>-1</sup> con cuatro explantes. Quince días después de establecido el experimento (DDE), se descartó el material contaminado por hongos y bacterias. Sesenta DDE (primer ensayo) y 30 DDE (segundo ensayo) se registró el porcentaje de explantes con presencia de exudados fenólicos, con respuesta morfogénica y porcentaje de explantes necróticos. Para el tercer ensayo las variables que se tomaron en cuenta fueron: número de explantes vivos, número de explantes con respuesta morfogénica, número de brotes, altura y ancho de brotes. La respuesta morfogénica se definió como cualquier cambio en el desarrollo de los explantes, es decir, crecimiento, formación de callo, raíces o brotes. Las variables se sometieron a un análisis de varianza y prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) para las comparaciones de medias entre tratamientos (SAS, 2003; versión 9.0).

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

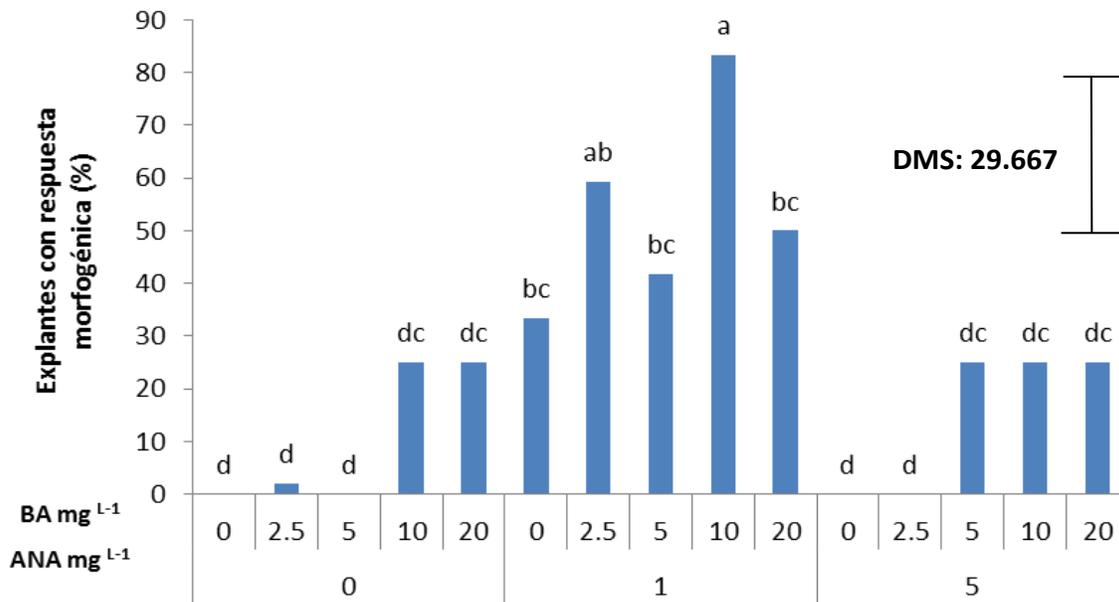
En el primer experimento, la interacción ANA\*BA resultó altamente significativa en todas las variables estudiadas. En cuanto a los efectos principales ANA afectó el número de explantes con respuesta morfogénica y el número de explantes necróticos; mientras que BA modificó la respuesta morfogénica de los explantes y la liberación de fenoles de los explantes (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Cuadrados medios y significancia del análisis de varianza para el efecto del ácido naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA) en explantes de *Phalaenopsis*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Explantes con respuesta morfogénica (%)	Explantes necróticos (%)	Explantes con exudados fenólicos (%)
ANA	2	8430.55**	3166.66**	793.88 <sup>NS</sup>
BA	4	1513.88**	555.55 <sup>NS</sup>	1782.77**
ANA * BA	8	1841.26**	1160.71**	1352.22**
ERROR	30	97.22	291.66	355.00

NS. No significativo, \* Significativo,  $P \leq 0.05$  y \*\* Significativo,  $P \leq 0.01$

El análisis de la interacción ANA\*BA indicó que es necesario el uso de fitohormonas para inducir respuestas morfogénicas en los explantes. Así, en el tratamiento sin ANA ni BA, los explantes no formaron brotes ni raíces. También en ausencia de ANA con niveles bajos de BA (2.5 y 5.0) la respuesta morfogénica fue baja o nula. Con 1 mg L<sup>-1</sup> de ANA y 10 mg L<sup>-1</sup> de BA se obtuvieron los mejores resultados (Figura 14).



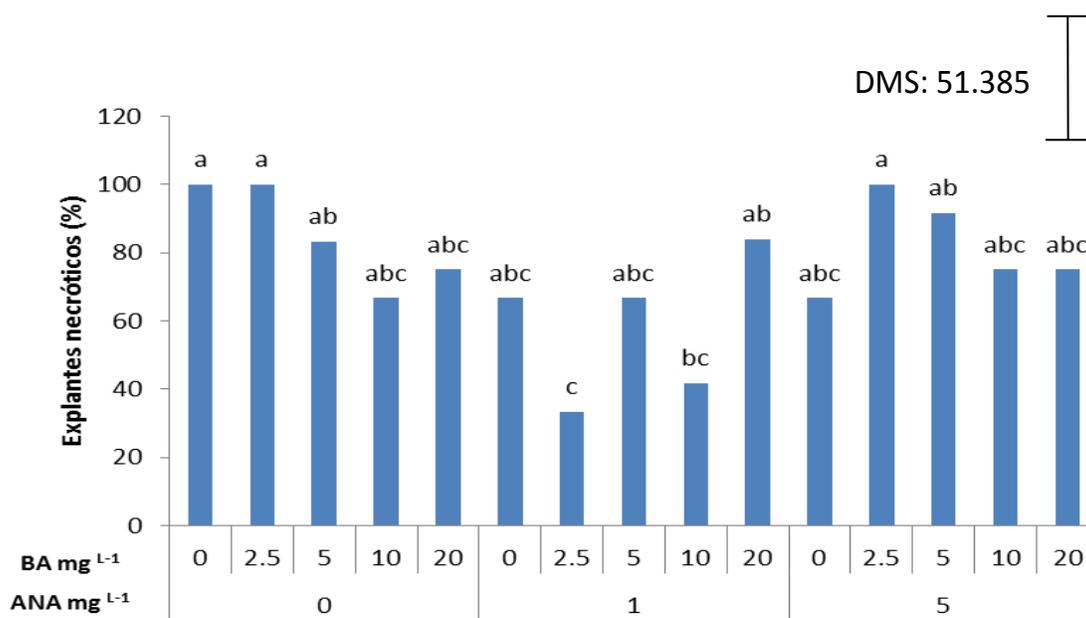
**Figura 14.** Respuesta morfológica *in vitro* de secciones de hojas de *Phalaenopsis* a la interacción de ácido naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA) en diferentes concentraciones. Letras distintas en las barras indican diferencias significativas. DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05).

La morfogénesis *in vitro* es un proceso muy complejo afectado por numerosos factores endógenos y externos con efectos acumulativos. La expresión del potencial embriogénico/organogénico solo ocurre en células donde los explantes son competentes o muestran respuesta favorable a medios de cultivo específicos que permite diferenciarlos entre embriones u órganos. Factores como la edad, condiciones ontogenéticas y fisiológicas, y el grado de diferenciación afectan la respuesta de los explantes en las condiciones *in vitro* (Elhiti y Stasolla, 2011).

Kuo *et al.* (2005) también observaron que concentraciones altas de BA (13.32 µM) y de TDZ (13.62 µM) como citocininas, promueven la formación de brotes en segmentos de hoja de *Phalaenopsis*. Chen y Chang (2006) utilizaron la concentración más alta de

TDZ ( $3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) en explantes de hojas de *Phalaenopsis* y lograron obtener embriones somáticos directamente de las células de la epidermis sin pasar por formación de callo después de 30 días de cultivo. Esto indica que las citocininas en altas concentraciones, promueven una mayor generación de brotes en explantes en esta orquídea.

La necrosis de los explantes se redujo hasta 35 % con el tratamiento de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA en combinación con  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$  de BA. Con  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA y  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de BA, la necrosis también disminuyó notablemente. En cambio, alcanzó el 100 % en ausencia de ambas fitohormonas. Algo similar ocurrió cuando se aplicaron  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$  de BA sin ANA o con  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de éste (Figura 15).



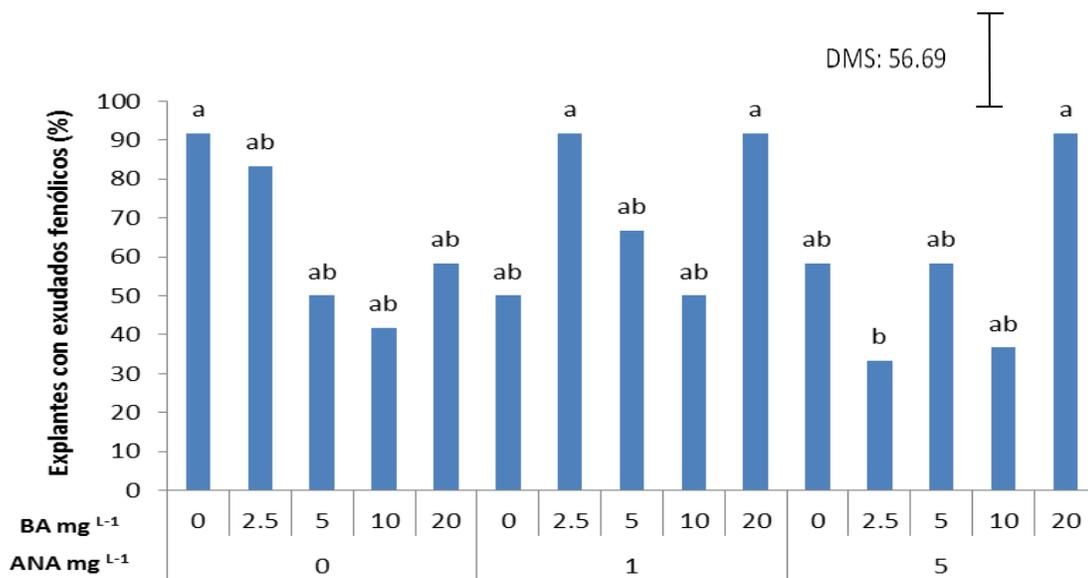
**Figura 15.** Influencia de la concentración de benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) sobre la necrosis de explantes de secciones de hojas de *Phalaenopsis* cultivadas *in vitro*. Letras distintas en las barras indican diferencias significativas. DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05).

Al respecto, Chen y Chang (2006) colocaron explantes de hojas de *Phalaenopsis* en un medio suplementado con ANA a diferentes concentraciones (0, 0.1, 1 mg·dm<sup>-3</sup>) y reportaron que todos los explantes tendieron a convertirse en necróticos y no encontraron embriones vivos, pero con 1 mg·dm<sup>-3</sup> de TDZ, se regeneraron embriones somáticos a los 20 días de cultivo.

La necrosis u oscurecimiento de tejidos cultivados *in vitro*, se puede definir como la oxidación por radicales libres de diferentes componentes celulares, también como la oxidación de compuestos fenólicos catalizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son sustancias químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño y muerte celular (Amiot *et al.*, 1996; Bray *et al.*, 2000).

Los explantes del tratamiento formado por 5 mg L<sup>-1</sup> de ANA y 2.5 mg L<sup>-1</sup> de BA fueron los que presentaron menor porcentaje de exudados fenólicos (35 %) Por el contrario, la elevada concentración de BA (20 mg L<sup>-1</sup>) así como la ausencia o bajos niveles de ANA promovieron la liberación de exudados fenólicos (Figuras 16).

Es importante cuidar el porcentaje de exudación fenólica, ya que su liberación inducen en los explantes la formación de cicatrices en las zonas de corte, lo cual evita la formación de nuevos brotes adventicios (Chugh *et al.*, 2009).



**Figura 16.** Influencia de la concentración de benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) sobre la liberación de fenoles al medio de cultivo de explantes de secciones de hojas de *Phalaenopsis*. Letras distintas en las barras indican diferencias significativas. DMS=Diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05).

El oscurecimiento enzimático de los tejidos, causado por la descomposición de compuestos fenólicos para formar quinonas, está principalmente catalizado por las enzimas polifenol oxidasa (Fraignier *et al.*, 1995), la tasa de oxidación fenólica puede ser disminuida mediante la reducción en la actividad de las enzimas oxidativas o la disminución del sustrato disponible para su oxidación (George, 1996). La actividad de las enzimas relacionadas con la biosíntesis y oxidación de los fenoles puede ser manipulada, y disminuye en ausencia de luz, como lo muestran diversos estudios (Villalobos y Arias, 1987; Marks y Simpson, 1990; Sudripta *et al.*, 1996, Seneviratne y Wijesekara, 1996; y León *et al.*, 1997). Asimismo, Ichihashi y Kako (1977) plantean la alteración del pH del medio de cultivo como una forma de reducir la actividad de las

PPO's, la cual es alta a pH de 6.5 y decrece a pH menores. Por ejemplo, Huang *et al.* (2002) encontraron correlación directa entre la actividad de la PPO's con el oscurecimiento de explantes en *Dendrocalamus latiflorus* y *Phyllostachys nigra*, indican que la actividad de la PPO's en los explantes fue mayor a pH 8 en el medio de cultivo, y decrece a pH menores. En su estudio demostraron, con extractos de la PPO, que su actividad enzimática es casi nula a pH menores de 7 y considerablemente alta a 9. Así, el uso temporal de un medio de cultivo más ácido reduciría los problemas de oxidación en explantes de *Phalaenopsis*.

También, George (1996) considera importante el tipo de gelificante que se utiliza, pues algunos tipos de agar presentan altos contenidos de cobre, cofactor enzimático, y en los explantes propensos a oxidarse puede ser un problema serio. Además indica, que el potencial osmótico del medio de cultivo puede aumentar o inhibir la biosíntesis de compuestos fenólicos, su difusión y oxidación.

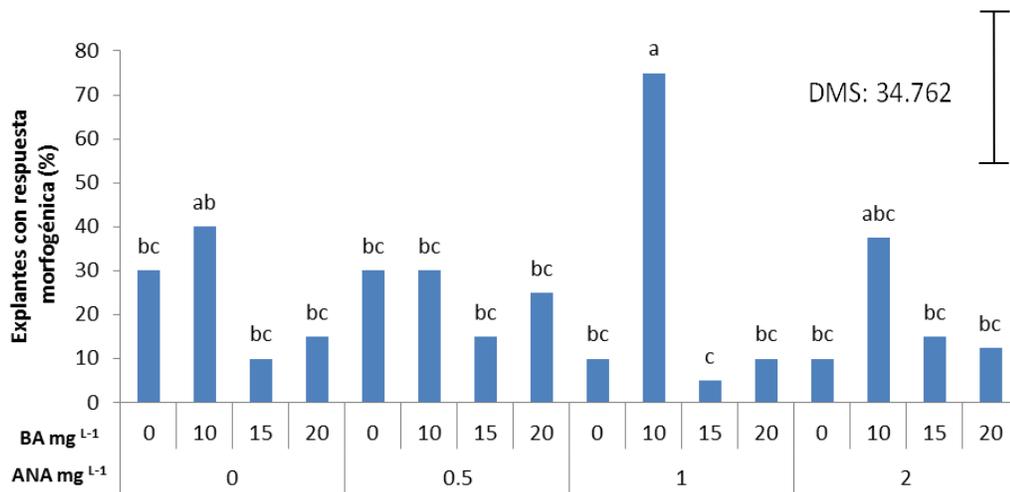
En el segundo experimento, resultaron significativos los factores ANA, BA y la interacción ANA\*BA en las variables explantes con respuesta morfogénica y explantes necróticos (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto del balance de ácido naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA) sobre tres variables estudiadas en explantes de *Phalaenopsis* cultivados *in vitro*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Explantes con respuesta morfogénica (%)	Explantes necróticos (%)	Explantes con exudados fenólicos (%)
<b>ANA</b>	3	430.91 <sup>NS</sup>	2660.79 <sup>**</sup>	458.06 <sup>NS</sup>
<b>BA</b>	3	532.64 <sup>NS</sup>	3377.89 <sup>**</sup>	265.08 <sup>NS</sup>
<b>ANA * BA</b>	15	1530.76 <sup>**</sup>	1563.40 <sup>**</sup>	199.83 <sup>NS</sup>
<b>ERROR</b>	62	412.80	477.31	237.90

NS. No significativo, \* Significativo,  $P \leq 0.05$  y \*\* Significativo,  $P \leq 0.01$

Al igual que en el primer experimento, la interacción ANA\*BA indicó que es necesario el uso de fitohormonas para inducir respuesta morfogénica favorable en los explantes y confirma que la mayor respuesta morfogénica se obtuvo con el tratamiento de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA en combinación con  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de BA (Figura 17). Concentraciones mayores de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  pueden causar toxicidad en los explantes. Una elevada producción de polifenoles está influenciada por los reguladores del crecimiento que son agregados al medio de cultivo (George 1996). No obstante, su efecto y relación con la toxicidad de los explantes no es consistente, pues un mismo regulador que induce oscurecimiento en una especie en otra no tiene este efecto. Debido, según Van Staden *et al.* (2006) a las diferencias genéticas entre los materiales.

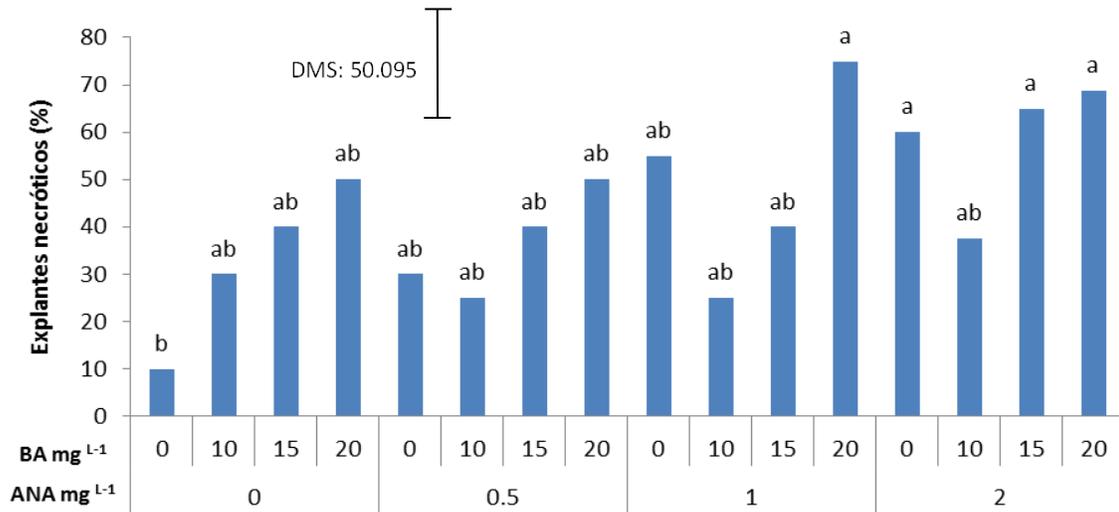


**Figura 17.** Respuesta morfológica de explantes de hojas de *Phalaenopsis* en respuesta a diferentes concentraciones de benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA).

Estos resultados muestran la importancia de las citocininas en la respuesta morfológica de los tejidos vegetales; sin embargo, es necesario considerar que la respuesta final depende más del balance hormonal que de la cantidad. En ese sentido, los niveles endógenos del material empleado tienen un papel decisivo (Margara, 1988; Pierik, 1990).

Los tratamientos donde se utilizaron altos niveles de hormonas incrementaron la necrosis de los explantes de *Phalaenopsis*. Por el contrario, el menor porcentaje de necrosis se obtuvo en ausencia de ambas fitohormonas (Figura 18). Esto se debe a que excesos de fitohormonas puede ocasionar un desbalance hormonal; el tipo, combinación y concentración de reguladores del crecimiento agregados al medio de cultivo, puede generar un estrés oxidativo, de tal manera, que los ROS generados

alteran diferentes vías metabólicas y respuestas fisiológicas del explante, incluso puede provocar su muerte (Van Staden *et al.*, 2006).

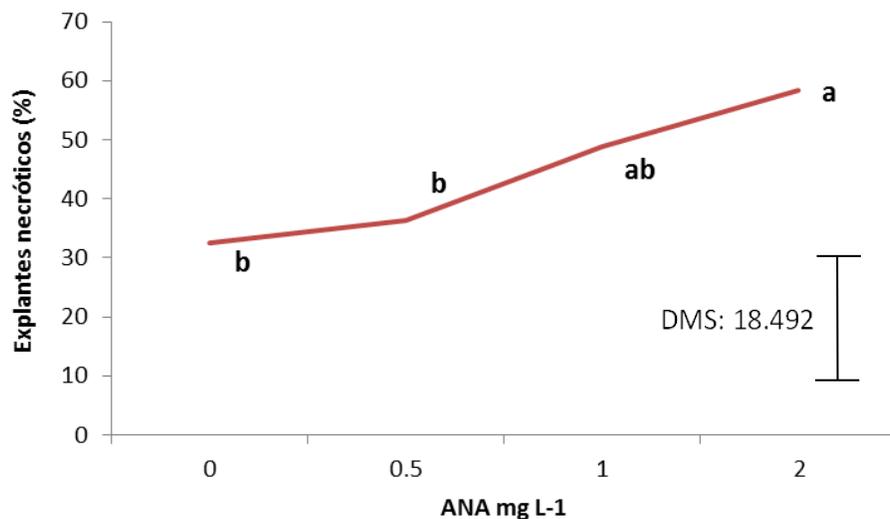


**Figura 18.** Explantes de hojas de *Phalaenopsis* que presentaron necrosis por efecto de los tratamientos en diferentes concentraciones de BA y ANA (Experimento 2).

En este sentido, Pedroza (2009) reporta que el desarrollo vegetativo de protocormos de *Epidendrum elongatum* se afectó con la interacción del ácido indolacético (AIA) y 6-benciladenina (BA) en sus concentraciones más altas (0.5 mg L<sup>-1</sup> y 1.0 mg L<sup>-1</sup>). Respuesta que de acuerdo con Azofeifa (2009), se atribuye a que las auxinas y citocininas son los grupos de reguladores del crecimiento más relacionados con el problema de necrosis en explantes. Dentro de las auxinas, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), y en las citocininas, la 6-benciladenina (BA), son los

reguladores con mayor número de referencias que asocian su uso con problemas de necrosis.

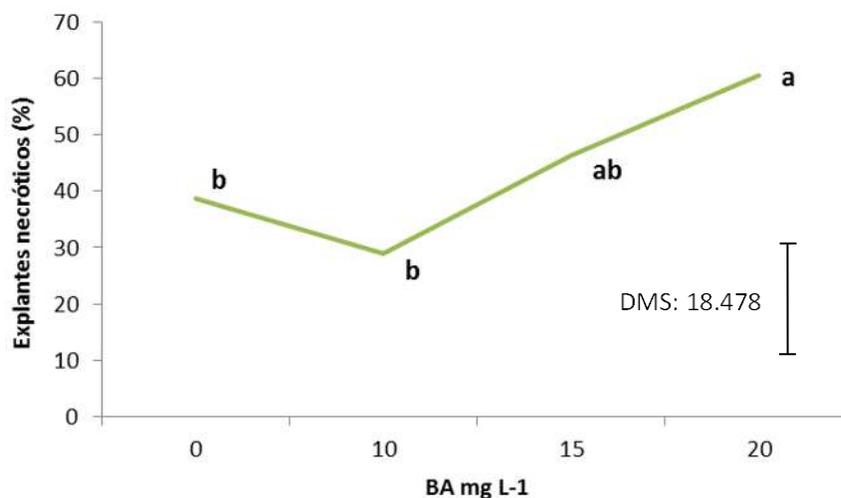
La concentración de ANA influyó significativamente en la formación de explantes necróticos; la menor cantidad (33 %) se obtuvo en ausencia de este regulador de crecimiento y conforme se incrementó su concentración, aumentó el porcentaje de explantes necróticos (Figura 19).



**Figura 19.** Efecto del ácido naftalenacético (ANA) en diferentes concentraciones sobre la necrosis de explantes de hojas de *Phalaenopsis* cultivadas *in vitro* (Experimento 2).

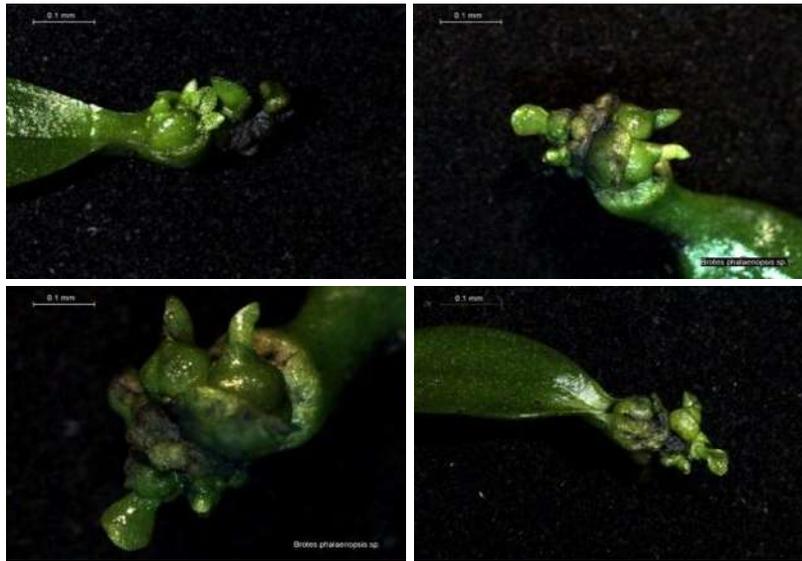
Respuesta similar encontró Mathur (1993), ya que logró la formación de callos de *Nardostachys jatamansi* en un medio MS adicionado con 1.6  $\mu\text{M}$  de ANA. Los callos cultivados en las concentraciones más elevadas de ANA mostraron altos niveles de oxidación y muerte de tejidos. Por su parte, Baker y Wetzstein (1994) cultivaron cotiledones inmaduros de *Arachis hypogaea* en niveles crecientes de auxinas, utilizaron ácido naftalenacético (ANA) en concentraciones de 20 a 50  $\text{mg L}^{-1}$  y 2,4 D en concentraciones de 5 a 60  $\text{mg L}^{-1}$ . Estos autores señalan que conforme aumentaron los niveles de auxinas en el medio de cultivo se incrementaron los problemas de oxidación en los explantes.

De igual forma que con el factor ANA, las concentraciones bajas de esta BA tuvieron efecto poco significativo en la necrosis de los tejidos, pero al aumentar su concentración se incrementó significativamente (60 %) el porcentaje de explantes necróticos (Figura 20).



**Figura 20.** Efecto de la concentración de benciladenina (BA) sobre la necrosis de explantes de hojas de *Phalaenopsis* cultivadas *in vitro*.

En general, los tratamientos sometidos a una concentración de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de BA, formaron brotes a partir de la yema axilar presente en la parte basal de la hoja (Figura 21).



**Figura 21.** Formación de brotes a partir de hojas de *Phalaenopsis* cultivados *in vitro* y expuestos a concentraciones de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de BA.

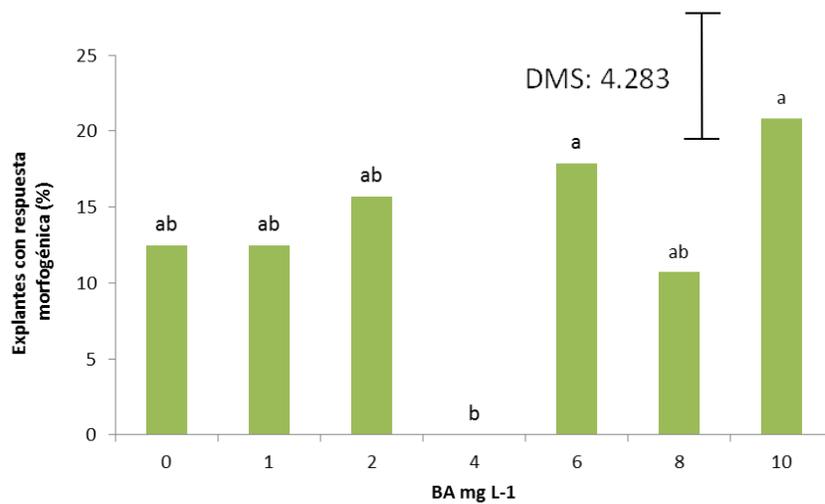
En el tercer experimento, sólo resultó significativo el factor BA en las cinco variables estudiadas (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto del medio de cultivo y la concentración de benciladenina (BA) en cinco variables estudiadas durante la micropropagación de *Phalaenopsis*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Explantos con respuesta morfológica (%)	Explantos necróticos (%)	Numero de brotes	Altura de brote	Ancho de brote
<b>Medio de cultivo</b>	1	0.52 <sup>NS</sup>	0.48 <sup>NS</sup>	0.02 <sup>NS</sup>	4.90 <sup>NS</sup>	6.90 <sup>NS</sup>
<b>BA</b>	6	0.80*	2.56**	0.75*	6.93*	51.83*
<b>Medio * BA</b>	6	0.70 <sup>NS</sup>	1.45 <sup>NS</sup>	0.67 <sup>NS</sup>	3.07 <sup>NS</sup>	37.16 <sup>NS</sup>
<b>ERROR</b>	34	0.29	0.70	0.36	1.62	37.01

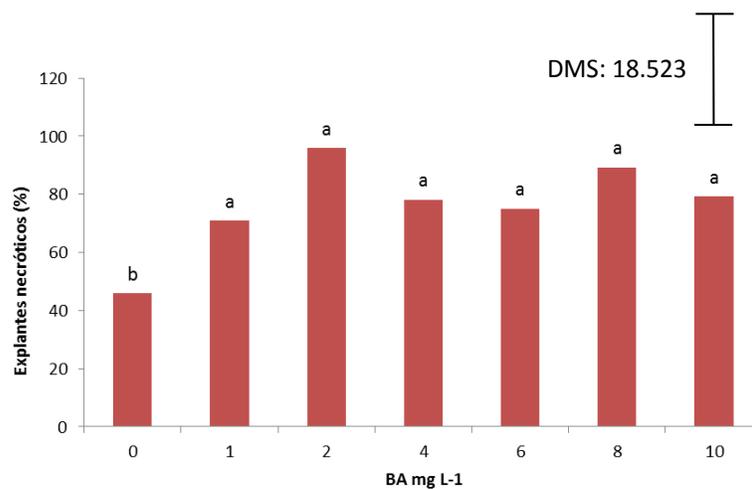
NS. No significativo, \* Significativo,  $P \leq 0.05$  y \*\* Significativo,  $P \leq 0.01$

Con 4 mg L<sup>-1</sup> de BA se obtuvo la menor respuesta morfológica. Todas las demás concentraciones, resultaron estadísticamente iguales entre sí (Figura 22).



**Figura 22.** Efecto de la benciladenina (BA) sobre la respuesta morfológica en explantes de hojas de *Phalaenopsis* cultivadas *in vitro* (Experimento 3).

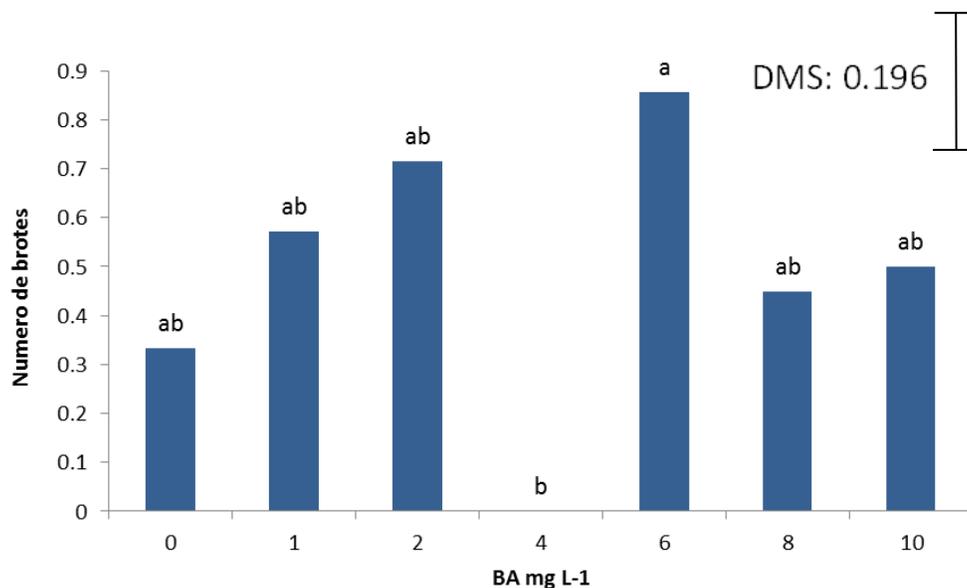
También se confirma que la BA es una hormona que causa necrosis en los tejidos de *Phalaenopsis*, ya que los tratamientos con cualquiera de las concentraciones evaluadas la necrosis fue mayor y estadísticamente diferentes al control (Figura 23).



**Figura 23.** Efecto de la concentración de benciladenina (BA) sobre la necrosis de explantes de hojas de *Phalaenopsis* cultivados *in vitro*.

En orquídeas, la concentración de BA también está relacionada con la supervivencia de los explantes. En este sentido, Espinosa *et al.* (2008) al utilizar BA en diferentes concentraciones (5.73, 7.64, 9.55, 11.46  $\mu\text{M}$ ) para la propagación *in vitro* de vainilla (*Vanilla planifolia*), obtuvieron los mejores resultados de supervivencia de explantes en el medio con menor contenido hormonal (5.73  $\mu\text{M}$ ).

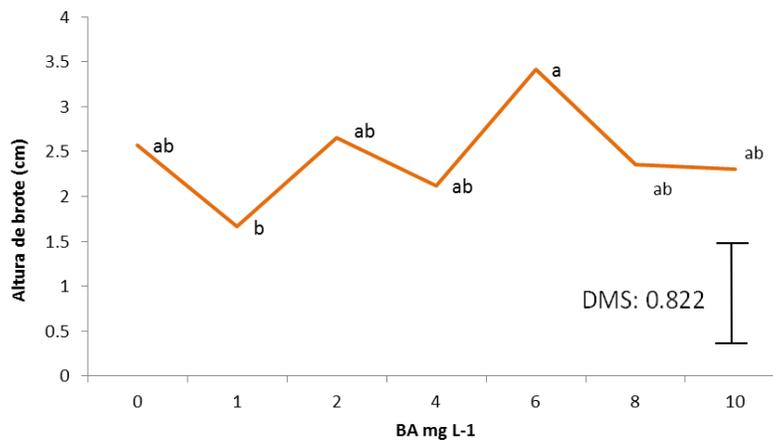
La concentración de BA que generó el mayor número de brotes fue 6  $\text{mg L}^{-1}$ ; sin embargo, resultó estadísticamente similar al resto, con excepción de 4  $\text{mg L}^{-1}$  (Figura 24).



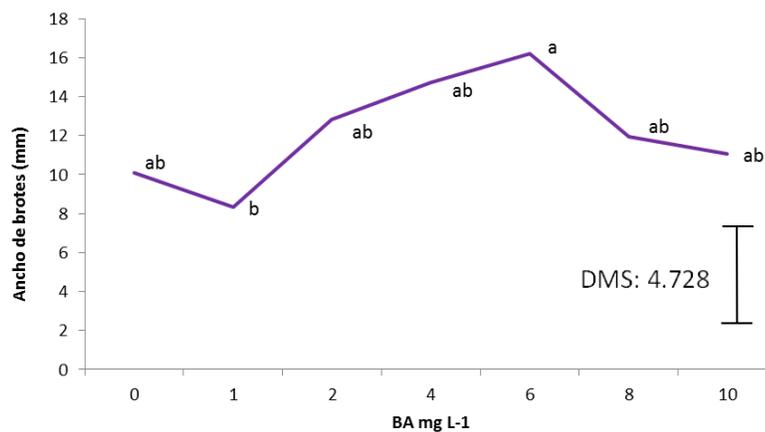
**Figura 24.** Efecto de la concentración de benciladenina (BA) sobre el número de brotes generados en explantes de hojas de *Phalaenopsis* cultivadas *in vitro*.

La altura y ancho de brotes mostraron un comportamiento similar, la concentración de benciladenina que generó la mejor y peor calidad de brotes fue 6 mg L<sup>-1</sup> y 1 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Los demás tratamientos resultaron intermedios y estadísticamente iguales entre sí. (Figura 25).

1)



2)



**Figura 25.** Efecto de la concentración de benciladenina (BA) sobre la altura y ancho de brotes generados en explantes de hojas de *Phalaenopsis* cultivadas *in vitro*.

#### IV. CONCLUSIONES

Es necesario utilizar fitohormonas para generar respuesta morfogénica en los explantes de *Phalaenopsis*.

Los explantes expuestos a la concentración de 10 mg L<sup>-1</sup> de BA mostraron mayor respuesta morfogénica en los experimentos realizados. Aunque incrementos en las concentraciones de hormonas provoca un mayor porcentaje de explantes necróticos.

El factor BA en concentraciones bajas o muy altas genera mayor porcentaje de exudados fenólicos en los explantes de *Phalaenopsis*.

El mayor número, altura y ancho de brotes se logró con la concentración de 6 mg L<sup>-1</sup> de BA.

## V. LITERATURA CITADA

**Amiot M., F. Forget and P. Goupy (1996)** Polyphenol, oxidation and color: progress in the chemistry of enzymatic and non-enzymatic derived products. *HerbaPolonica* 42: 237-247.

**Arditti J. (1977)** Clonal propagation of orchids by means of tissue culture a manual. *In: Orchid Biology Reviews and Perspectives*, Cornell University Press, Ithaca, pp. 203-293.

**Azofeifa A. (2009)** Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Universidad de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana* 20(1): 153-175.

**Baker C. and H. Wetzstein (1994)** Influence of auxin type and concentration on peanut somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36: 361-368.

**Bray E., J. Bailey-Serres and E. Weretilnyk (2000)** Responses to abiotic stresses. *In: Buchanan B., W. Gruissem and R. Jones, eds. Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. p. 1158-1203.

**Chen J. and W. Chang (2006)** Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. *Biology Plant*. 50: 169–173.

**Chugh S., S. Guha and U. Rao (2009)** Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae* 122(4): 507-520.

**Elhiti M. and C. Stasolla (2011)** The use of zygotic embryos as explants for *in vitro* propagation: an overview. In: Thorpe TA, Yeung EC (eds) Plant embryo culture, vol 710. Methods in molecular biology. Humana Press, pp 229-255.

**Espinosa H., J. Murguía, B. García and A. Córdova (2008)** *In vitro* clonal propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* 'Andrews'). HortScience 43(2):454–458.

**Fraignier M., L. Marques, A. Fleuriet y J. Macheix (1995)** Biochemical and immunochemical characteristics of polyphenol oxidases from different fruits of Prunus. Journal of Agricultural and Food Chemistry 43: 2375- 2380.

**George E. (1996)** Plant propagation by tissue culture; part 2. In Practice. 2 ed. Exegetics Limited. England. 1361 p.

**Griesbach R. (2002)** Development of *Phalaenopsis* Orchids for the Mass-Market, Trends in new crops and new uses. ASHS Press, Reprinted from: Trends in new crops and new uses.

**Gu Z., C. Pauline, M. Michael and J. Arditti (1987)** The effect of benzyladenine 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and indolacetic acid on shoot tip culture of *Cymbidium*. Lindleyana 2(2): 88-90.

**Huang L., Y. Lee, B. Huang, C. Kuo and J. Shaw (2002)** High polyphenol oxidase activity and low titratable activity in browning bamboo tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology –Plant* 38: 358–365.

**Ichihashi S. and S. Kako (1977)** Studies in clonal propagation of *Cattleya* by tissue culture. II. Browning of *Cattleya*. *Journal Japanese Society for Horticultural Science* 46: 325-330.

**Ishii Y., T. Takamura, M. Goi and M. Tanaka (1998)** Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Reports journal* 17: 446-450.

**Islam M., S. Ichihashi and S. Matsui (1998)** Control of growth and development of protocorm like body derived from callus by carbon sources in *Phalaenopsis*. *Plant Biotechnology* 15(4): 183-187.

**Kuo H., Chen J. and Chang W. (2005)** Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* “Little Steve” *Society for In Vitro Biology. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant.* 41: 453–456.

**León S., L. Arenas y Z. Vilorio (1997)** Efecto de la exposición solar de las plantas donantes en la iniciación del cultivo *in vitro* de guayabo (*Psidium guajava* L). *LUZ. Revista Facultad de Agronomía* 14: 47-53.

**Margara J. (1988)** Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*: Los meristemos y la organogénesis. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. España. 232 p.

**Marks T. and E. Simpson, (1990)** Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field- grown stock plants to darkness or low levels of irradiance. Journal of Horticultural Science 65: 103-111.

**Murashige T. and F. Skoog (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

**Mathur J. (1993)** Somatic embryogenesis from callus cultures of *Nardostachys jatamansi*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 33 (2): 163-169.

**Pedroza J. (2009)** Efecto del carbón activado, ácido indolacético (AIA) y bencil amino purina (BAP) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq bajo condiciones *in vitro*. Rev. Colombiana de biotecnología 11((1): 17-32.

**Pierik R. (1990)** Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. España. 326 p.

**Raya Y., A. Villegas y G. Arellano (2009)** Cinética de enraizamiento *in vitro* de dos portainjertos de vid en función de la fuente y concentración de azúcar. Revista Fitotecnia Mexicana 32(2): 111-117.

**Runkle E. (2007)** Innovative production systems for ornamental potted plants: A case study for *Phalaenopsis* orchids. ISHS Acta Horticulturae 755: International Conference on Quality Management in Supply Chains of Ornamentals.

**SAS Institute (2003)** SAS/STAT User`s Guide. Release 9 Edition. Cary, NC, USA.

**Seneviratne P. and G. Wijsekara (1996)** The problem of phenolic exudates in *in vitro* culture of mature *Hevea brasiliensis*. Journal of Plantation Crop 24: 54-62.

**So-Young P., M. Hosakatte and P. Kee-Yoeup (2002)** Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant 38: 168–172.

**Sudripta D., B. Timir, and J. Sumita (1996)** *In vitro* propagation of cashewnut. Plant Cell Reports 15: 615-619.

**Tanaka M. (1992)** Micropropagation of *Phalaenopsis* spp. In: Bajaj, Y. P. S., ed. Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 20. Berlin: Springer Verlag; 246-268.

**Tanaka M., and Y. Sakanishi (1985)** Regenerative capacity of *in vitro* cultured leaf segments excised from mature *Phalaenopsis* plants. Bulletin University of Osaka Prefect. B. 37: 1-4.

**Vajrabhaya T. (1997)** Orchid Biology. Part I. Cornell University Press, Ithaca, New York, pp: 179-201.

**Van Staden J., C. Fennell and N. Taylor (2006)** Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. Acta Horticulturae 725: 55-62.

**Villalobos I. y O. Arias (1987)** Inducción y multiplicación de callos *in vitro* en tres cultivares comerciales de caña de azúcar (*Saccharum* spp). Agronomía costarricense 11: 39-44.

**Yam T., R. Ernst, J. Arditti and S. Ichihashi (1991)** The effects of complex additives and 4-dimethylamino pyridine on the proliferation of *Phalaenopsis* protocormos. Lindleyana 6(1): 24-26.

# ANEXOS

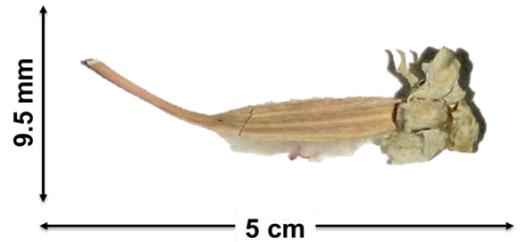
## Primera etapa de polinización

### Cruza

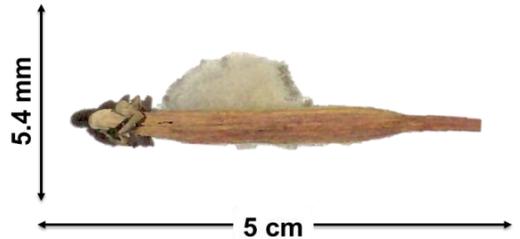
### Cápsula de la cruz



Darwin x Darwin



Darwin x Ravena



Darwin x Dallas



## Cruza

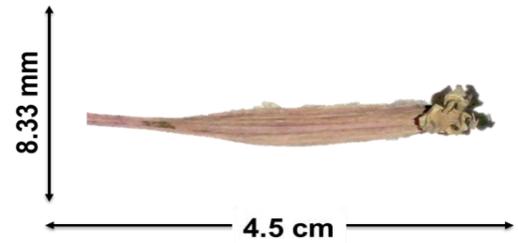
## Cápsula de la cruza



Helena x Helena



Helena x Dallas



Katmandú x Dallas



# Segunda etapa de polinización

## Cruza

## Cápsula de la cruza



Dublín x Dublín



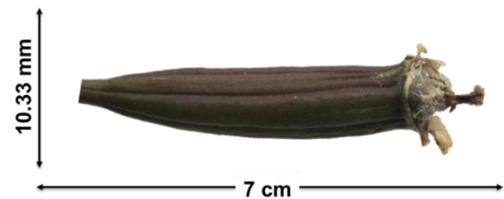
Dublín x Darwin



Dublín x Helena



Dublín x Dallas



## Cruza

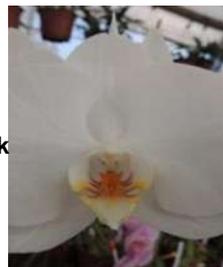
## Cápsula de la cruza



Dublín x Manhattan



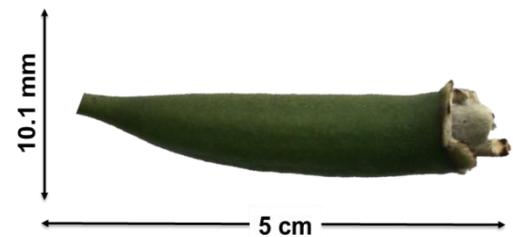
Dublín x Woodstock



Dublín x Katmandú



Dublín x Darwin

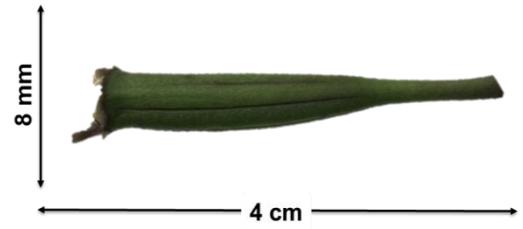


## Cruza

## Cápsula de la cruza



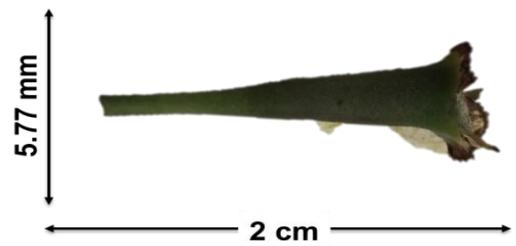
Darwin x Darwin



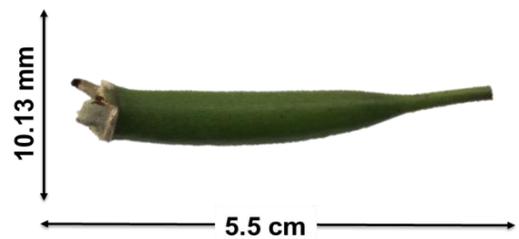
Darwin x Helena



Darwin x Ravena



Darwin x Dallas

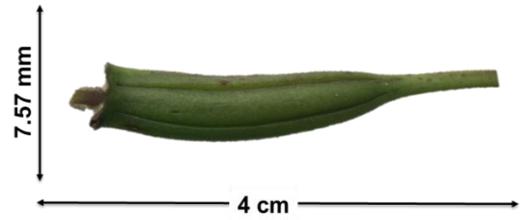


## Cruza

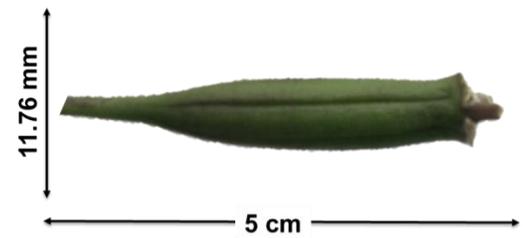
## Cápsula de la cruza



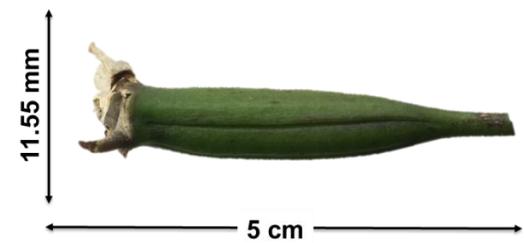
Darwin x Manhattan



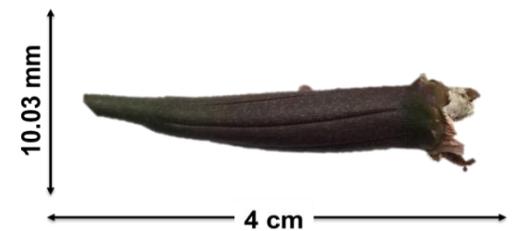
Darwin x Woodstock



Darwin x Katmandú



Helena x Dublín

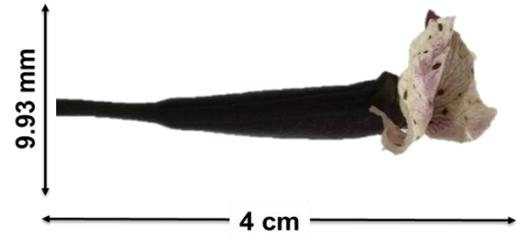


## Cruza

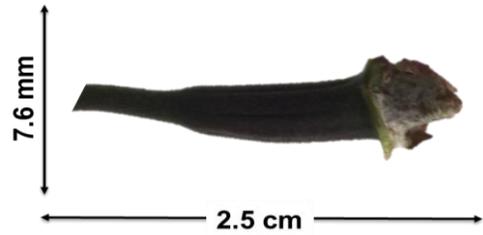
## Cápsula de la cruza



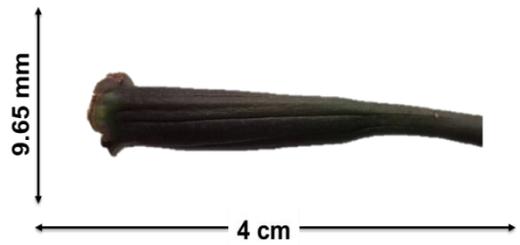
Helena x Darwin



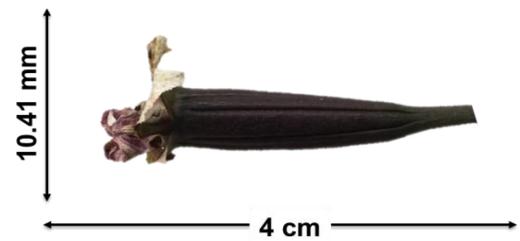
Helena x Helena



Helena x Dallas



Helena x Katmandú

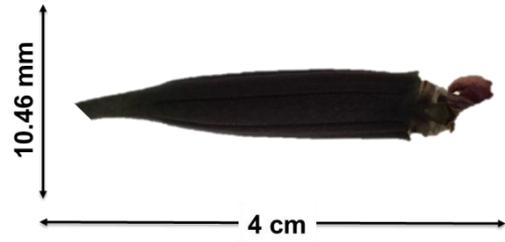


## Cruza

## Cápsula de la cruza



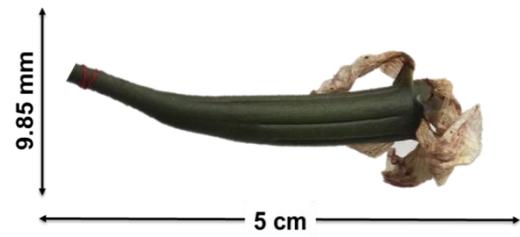
Helena x Katmandú



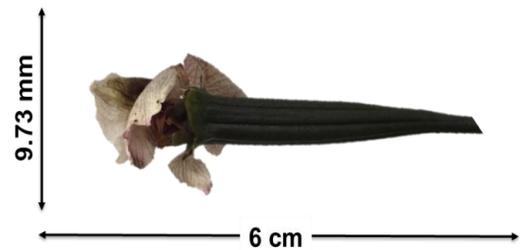
Ravena x Dublín



Ravena x Darwin



Ravena x Helena



## Cruza

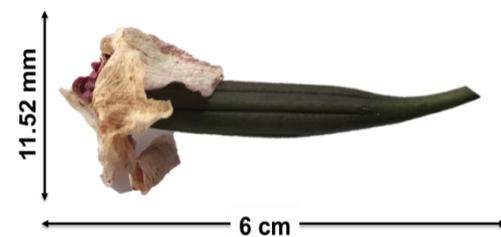
## Cápsula de la cruz



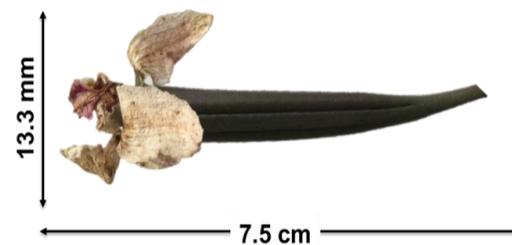
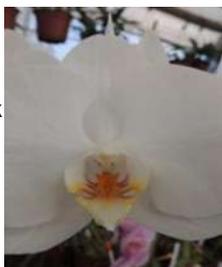
Ravana x Dallas



Ravana x Manhattan



Ravana x Woodstock



Ravana x Katmandú

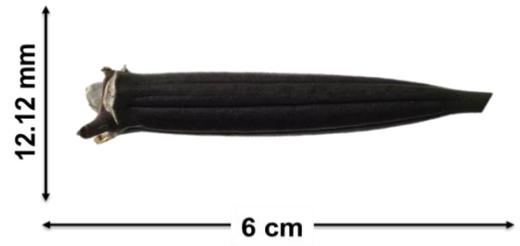


## Cruza

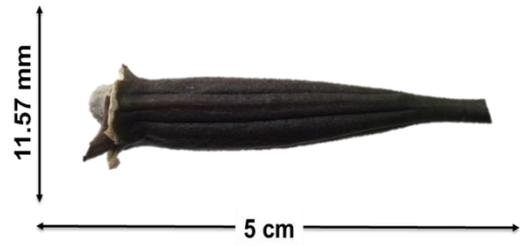
## Cápsula de la cruza



Dallas x Dublín



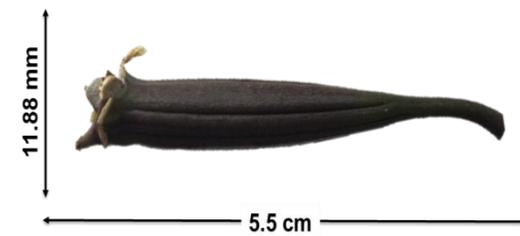
Dallas x Darwin



Dallas x Ravena



Dallas x Dallas



## Cruza

## Cápsula de la cruza



Dallas x Woodstock



Dallas x Katmandú



Manhattan x Dublín



Manhattan x Darwin



## Cruza

## Cápsula de la cruza



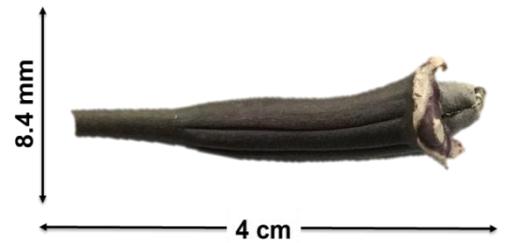
Manhattan x Helena



Manhattan x Dallas



Manhattan x Woodstock



Manhattan x Katmandú



## Cruza

## Cápsula de la cruza



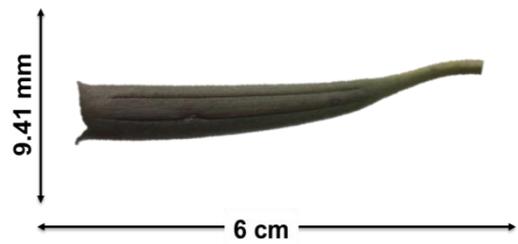
Woodstock x Dublín



Woodstock x Darwin



Woodstock x Helena



Woodstock x Manhattan



## Cruza

## Cápsula de la cruz



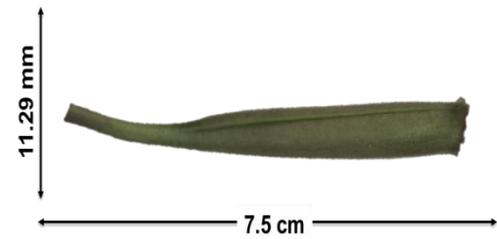
Woodstock x Woodstock



Woodstock x Katmandú



Katmandú x Dublín



Katmandú x Darwin



## Cruza

## Cápsula de la cruz



Katmandú x Helena



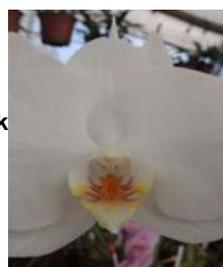
Katmandú x Dallas



Katmandú x Manhattan



Katmandú x Woodstock



## Cruza

## Cápsula de la cruza



Katmandú x Katmandú

