


Regeneración *in vitro* de *Laelia anceps ssp. dawsonii*

In vitro regeneration of *Laelia anceps ssp. dawsonii*

Hilda E. LEE ESPINOSA ^{1,2}, Antonio LAGUNA CERDA¹, Joaquin MURGUÍA GONZÁLEZ², Pablo ELORZA MARTÍNEZ³, Lourdes IGLESIAS ANDREU⁴, Benjamin GARCÍA ROSAS¹, Felipe A. BARREDO POOL⁵ y Nancy SANTANA BUZZY⁵

¹Universidad Autónoma del Estado de México. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Centro Universitario "El Cerrillo" Km. 15 Carretera Toluca-Ixtlahuaca, Veracruz, México; ²Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales. Carretera Peñuela-Amatlán Km. 1, Peñuela, Municipio de Amatlán de los Reyes, Veracruz. Tel-Fax: (271)71-66410 y 66129; ³Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Carretera Tuxpan-Tampico Km. 7,5 Col. Universitaria C.P. 92850, Tuxpan, Veracruz, México. Tel-Fax: (782) 83489-79, 83 443-50; ⁴Laboratorio de Biotecnología y Ecología Aplicada (LABIOTECA), Universidad Veracruzana. Campus para la Cultura, las Artes y el Deporte, Xalapa, Veracruz, C.P. 91001, México y ⁵Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 # 130, Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán, C.P. 97200, México. E-mails: kalapana66@hotmail.com; alc@uaemex.mx; jmurguiag@yahoo.com.mx y pelorzam70@hotmail.com  Autor para correspondencia.

Recibido: 29/10/2007 Fin de primer arbitraje: 21/11/2007 Primera revisión recibida: 23/11/2007
Fin de segundo arbitraje: 15/12/2007 Segunda revisión recibida: 19/12/2007 Aceptado: 29/12/2007

RESUMEN

Se germinaron *in vitro* semillas de *Laelia anceps ssp. dawsonii*, una orquídea silvestre amenazada, originaria de México y Mesoamérica, con alto potencial ornamental, utilizando el medio Murashige & Skoog (1962) suplementado con ácido 1-naftalén-acético (ANA), 6-benzyl-amino-purina (BAP), Kinetina (Kin) y ácido indol-3-acético (AIA), 2 mg L⁻¹ de cada uno, el cual resultó óptimo para la inducción de callo bajo fotoperiodo de 16/8 h (20.2 μmol•m⁻²•s⁻¹). El callo fue subcultivado a intervalos de 45 días en el mismo medio de cultivo, produciendo en promedio 524 embriones somáticos en el tercer subcultivo. Los embriones somáticos producidos se convirtieron en plantas completas con brotes y raíces en el mismo medio, y fueron transferidas al medio VW suplementado con BAP 2 mg L⁻¹, AIA 1 mg L⁻¹ y carbón activado 0.2 % para su desarrollo. Después de aproximadamente tres meses, las plántulas fueron aclimatizadas en el invernadero con un 100 % de tasa de sobrevivencia.

Palabras clave: Orchidaceae, morfogénesis, callos embriogénicos, embriones somáticos, embriogénesis somática.

ABSTRACT

Seeds of *Laelia anceps ssp. dawsonii* were germinated *in vitro*, this is a wild endangered orchid, originated in México and Mesoamerica, with a high ornamental potential. Murashige & Skoog (1962) culture media, supplemented with 1-naftalen-acetic acid (ANA), 6-benzyl-amino-purine (BAP), Kinetin (Kin) and indol-3-acético (AIA) acid, 2 mg L⁻¹ each one, was optimum for callus induction under 16/8 h photoperiod (20.2 μmol•m⁻²•s⁻¹). Callus was subcultured every 45 days in the same culture medium producing 524 somatic embryoids in average, at the end of the third subculture. Somatic embryoids germinated in plants with shoots and roots in the same culture medium, and were transferred to VW supplemented with 2 mg L⁻¹ BAP, 1 mg L⁻¹ AIA and 0.2 % active charcoal to induce their develop. Three months later, plantlets were acclimatized in a greenhouse, with 100 % survivence.

Key words: Orchidaceae, morphogenesis, embryogenic callus, somatic embryos, somatic embryogenesis.

Abreviaturas: ANA=ácido 1-naftaleno acético; BAP=6, benzyl-amino-purina; AIA=ácido indol-3-acético; Kin= kinetina; MS= Murashige & Skoog; KC= Knudson C; VW= Vacin & Went; ESs=embriones somáticos.

INTRODUCCIÓN

Laelia anceps es una orquídea silvestre, epífita, que actualmente se encuentra en grave peligro de extinción, debido principalmente al fuerte saqueo al que ha sido expuesta desde hace muchos años. El género *Laelia* está compuesto por 11 especies, epífitas, todas ellas sobresalientes por su gran atractivo.

Esta especie se encuentra localizada principalmente en las vertientes del Golfo y Pacífico mexicanos (Halbinger, 1993) y fue clasificada por Soto (1993) quien reporta dos distintas formas, la forma *chilapensis*, de Guerrero, y la forma *dawsonii* con inflorescencias de 40 a 60 cm de largo, con una a tres flores blancas grandes y vistosas en la parte terminal, y un diámetro promedio de 12-16 cm; el lóbulo medio del labelo es púrpura oscuro (Figura 1).



Figura 1. Inflorescencia de *Laelia anceps* subespecie *dawsonii*.

Cultivada en forma tradicional, actualmente se encuentra en muy grave peligro de extinción al enfrentar severos problemas de conservación como resultado de su colecta excesiva para venderla como planta para maceta, así como sus flores cortadas (Halbinger, 1993), por lo que se incluye en la Norma Oficial Mexicana del 2002. Aunada a esta situación, posee una extremadamente baja tasa de propagación, ya que sus semillas poseen únicamente del 1-5 % de potencial germinativo requiriendo la presencia de micorrizas para elevar este porcentaje (Martin & Pradeep, 2003). El cultivo de tejidos vegetales resulta de gran utilidad para la propagación de plantas, a escalas mayores que las obtenidas por métodos tradicionales (Rao, 1998; Murthy y Pyati, 2001; Lee y Lee, 2003; Shimura y Koda, 2004) y una de sus principales rutas de diferenciación morfogénica. La embriogénesis somática, actualmente permite la

propagación masiva mediante la germinación *in vitro* de semillas inducidas a la formación de callos que producen embriones somáticos (estructuras bipolares, independientes del tejido original) elevando su capacidad reproductiva a través del manejo adecuado de las condiciones físicas y químicas del ambiente de cultivo. Existen numerosos protocolos de embriogénesis somática en orquídeas, a partir de explantes, tales como yemas axilares, ápices, secciones de hoja y semillas fecundadas e inmaduras (Cheng y Chang, 2000, 2003, 2004b; Huan, *et al.*, 2004), existiendo reportes en híbridos comerciales como *Phalaenopsis amabilis* var. Formosa shimadzu (Cheng y Chang, 2004a) y otros más. En el género *Laelia*, reportes de Santos-Hernández *et al.*, 2005, Potisek *et al.*, 1994, Avila y Salgado, 2006, mencionan la germinación de semillas en *Laelia albida*, *Laelia rubescens* Lindley, *Laelia autumnalis*, etc. no existiendo reportes de embriogénesis somática para esta especie.

En el presente trabajo se desarrolló una metodología para la regeneración *in vitro* de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*, como estrategia inicial de rescate, y con el objetivo de permitir eventualmente su uso sustentable y la repoblación de hábitats

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal utilizado

Se seleccionó a la especie *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*, cultivada en el municipio de Fortín en el estado de Veracruz en México. Las semillas maduras fueron extraídas de las cápsulas, antes de su dehiscencia, y establecidas *in vitro*, en diferentes medios de cultivo que fueron probados de manera preliminar, para la inducción inicial de morfogénesis, y obtención del material utilizado en experimentos posteriores.

Medios de cultivo básicos.

Se utilizaron tres medios básicos: Murashige & Skoog (MS, 1962), Knudson C (KC, 1946) y Vacin & Went (VW, 1949), suplementados con 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 30 000 mg L⁻¹ de sacarosa, 5 mL L⁻¹ de solución de vitaminas de MS y como agente gelificante se utilizaron 2 500 mg L⁻¹ de Phytigel. En los medios MS y KC el pH fue ajustado a 5.7±0.1 y en el medio VW a 4.8±0.1 con NaOH 1 N o HCl, antes de la esterilización en autoclave durante 17 min a 1.05 Kg cm⁻².

Inducción de la germinación *in vitro*

Se utilizaron los medios de cultivo básicos de MS y VW, suplementados como se indicó anteriormente y adicionados con las combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal: ANA, BAP, AIA, 2.0 mg L⁻¹ c/u y ANA, BAP, 2.0 mg L⁻¹ c/u. Estos medios de cultivo, fueron esterilizados, dosificándose en cajas de Petri a razón de 15 mL en cada una, inoculándose posteriormente con 5 mg de semillas. Se utilizaron 20 repeticiones para cada combinación de reguladores de crecimiento vegetal, consistentes en 5 mg de semillas que fueron depositados en la superficie del medio de cultivo. Los cultivos fueron incubados bajo condiciones de fotoperiodo de 16/8 h (20.2 μmol•m⁻²•s⁻¹ de lámparas de luz fluorescente marca Phillips tipo blanco frío), a una temperatura de 23 ± 1 °C durante 45 días. Una vez diferenciado el tejido de callo, se utilizó como fuente de explantes para posteriores experimentos.

Efecto de las condiciones de cultivo (oscuridad y el fotoperiodo de 16/8 h) sobre la morfogénesis de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*

Para evaluar el efecto de las condiciones de incubación sobre la regeneración y diferenciación de estructuras morfogénicas, se estableció un experimento completamente aleatorizado, probando los medios de cultivo: MS, KC y VW, bajo condiciones de fotoperiodo de 16/8 h (33.78 μmol•m⁻²•s⁻¹) y oscuridad. Los medios de cultivo fueron suplementados con la combinación de reguladores de crecimiento vegetal ANA, BAP, AIA, 2.0 mg L⁻¹ c/u, utilizando diez repeticiones por tratamiento, consistentes cada una en un callo con la misma textura, consistencia y coloración en todos los tratamientos, distribuyéndose individualmente en frascos de cultivo conteniendo cada uno 20 mL del medio, siendo éstas 10 repeticiones; los experimentos se repitieron dos veces en el tiempo. Las evaluaciones del número de embriones somáticos, coloración y vigor de los callos, se realizaron a las cinco semanas de cultivo en incubación.

Efecto de reguladores de crecimiento sobre la morfogénesis de los embriones somáticos

Porciones de callo embriogénico de aproximadamente 2 mm de diámetro, fueron seleccionadas para establecer un experimento completamente aleatorizado, probando tres combinaciones de reguladores de crecimiento (RCV):

RCV₁ (ANA,BAP,AIA); RCV₂ (Kin, ANA, BAP) y RCV₃ (ANA, BAP), y dos períodos de tiempo de desarrollo (4 y 6 semanas), sobre la morfogénesis de los callos y capacidad multiplicativa de los embriones somáticos; en todos los casos se utilizaron 2 mg L⁻¹ de cada uno de los reguladores de crecimiento, y el medio de cultivo básico de MS suplementado con 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 5 mL L⁻¹ de solución de vitaminas MS, 30 g L⁻¹ de sacarosa y 2 g L⁻¹ de Phytigel. Se utilizaron 40 explantes por tratamiento, distribuidos a razón de 10 explantes por frasco, y el experimento se repitió cuatro veces, utilizando diez repeticiones para los testigos sin reguladores de crecimiento. Los frascos fueron incubados bajo fotoperiodo de 16/8 h (33.78 μmol•m⁻²•s⁻¹) a una temperatura de 23 ± 1 °C. Se realizaron las evaluaciones del número de embriones formados por período de incubación, y se determinó el promedio del número de embriones somáticos desarrollados en cada tratamiento.

Efecto de los subcultivos sobre la multiplicación de los embriones somáticos

Se cultivaron *in vitro* 60 embriones somáticos en estadio temprano de ~ 2 mm de longitud (Figura 2), con la finalidad de determinar el número de subcultivos más adecuado para lograr una multiplicación eficiente de los mismos, en un experimento completamente aleatorizado, donde se probaron diferentes tiempos de subcultivo: 21, 30, 45 y 90 días, manteniendo un testigo sin subcultivar, y tres subcultivos por cada tiempo, excepto el frasco de cultivo de 90 días, el cual se subcultivó sólo una vez, efectuando el recuento a los 180 días de iniciado el experimento. Los ESs fueron distribuidos a razón de 5

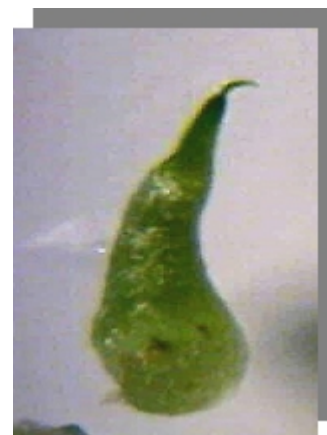


Figura 2. Embrión somático de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*, en estadio de plúmula, de aproximadamente 2 mm de longitud.

por cada frasco de cultivo que contenía 20 mL del medio MS suplementado con ANA, BAP, AIA, 2.0 mg L⁻¹ c/u; el experimento contó con un total de 12 frascos, tres por tratamiento, y se repitió dos veces en el tiempo. Se utilizó un frasco como control, el cual no se subcultivó, y el conteo de embriones somáticos se realizó 180 días después de su inoculación. Se evaluó el número de embriones somáticos formados en cada subcultivo así como la frecuencia de formación de los mismos.

Germinación de embriones somáticos y regeneración de plantas

Los embriones somáticos que maduraron adecuadamente hasta un estado avanzado de desarrollo, se transfirieron a frascos de cultivo conteniendo 40 mL del medio basal VW, suplementado de la manera antes descrita y adicionado con BAP 2 mg L⁻¹, AIA 1 mg L⁻¹ y carbón activado 0.2% para el desarrollo de las plántulas.

RESULTADOS

Inducción de la germinación *in vitro*

Se logró un 100 % de prendimiento de las semillas, que evolucionaron formando abundante callo (Figura 3 A) de aspecto friable, típicamente embriogénico, en el medio MS adicionado con ANA, BAP, AIA 2 mg L⁻¹ de cada uno; en el medio VW adicionado con la misma combinación de reguladores de crecimiento, sólo se logró la germinación normal de las semillas hasta la fase de protocormo (PLB) ligeramente ensanchado (Figura 3 B).

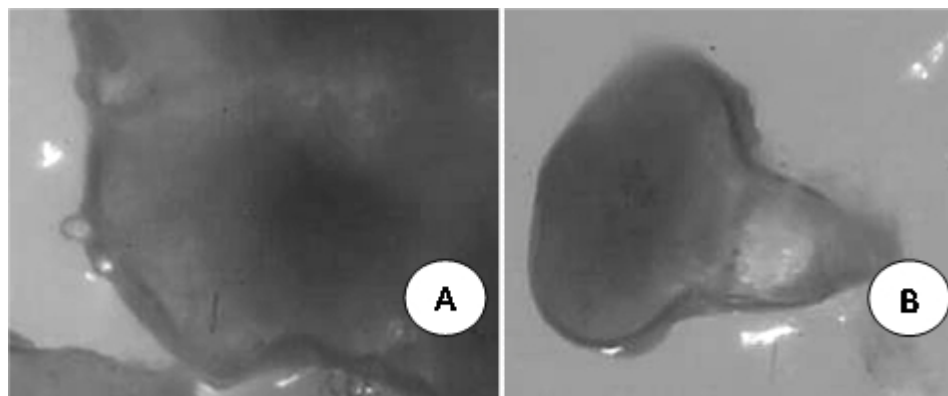


Figura 3. Procesos morfogénicos inducidos en semillas de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii* cultivadas *in vitro* en dos medios de cultivo. A) Desarrollo en el medio MS + ANA, BAP, AIA, 2 mg L⁻¹ c/u; B) Desarrollo en el medio VW + ANA, BAP, AIA 2 mg L⁻¹ c/u.

Efecto de las condiciones de cultivo (oscuridad y el fotoperiodo de 16/8 h) sobre la morfogénesis de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*

Como resultado de la exposición de los callos a condiciones de fotoperiodo (33.78 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y oscuridad, en los diferentes medios basales de cultivo, fue posible observar una mayor eficiencia en la proliferación de callo y la formación de embriones somáticos bajo condiciones de fotoperiodo, y medio MS en el cual se formó un promedio de 165.2 embriones somáticos y abundante callo embriogénico de color verde intenso; con el medio KC se indujo la formación de 97.6 embriones somáticos. En condiciones de oscuridad el medio MS logró inducir en promedio 86 embriones somáticos y el medio Knudson C indujo la formación de 56.6 embriones somáticos. El medio de cultivo VW, al parecer, resultó tener la menor capacidad morfogénica, mostrando en las dos condiciones evaluadas, los menores promedios de formación de embriones somáticos, de apenas 26 en fotoperiodo y bajo condiciones de oscuridad produjo apenas 15,2 ESs (Figura 4).

Efecto de reguladores de crecimiento sobre la morfogénesis de los embriones somáticos

Los segmentos de callo mostraron diferentes capacidades morfogénicas en cada una de las combinaciones de RCV utilizadas; se pudo observar que con la combinación de las auxinas ANA y AIA con BAP en RCV₁ se logró estimular la mayor proliferación de callo embriogénico apreciando una muy escasa proliferación en esta respuesta al disminuir el aporte de auxinas endógenas, y elevar el

contenido de citocininas en RCV₂ con un detrimento en el rendimiento del proceso, en los dos períodos de tiempo evaluados; sin embargo, en RCV₃, conteniendo una citocinina y una auxina se observó una respuesta intermedia, probablemente debido al equilibrio en la relación auxina-citocinina, utilizado en este último tratamiento.

Respecto a la producción de embriones somáticos, el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal, los tiempos de subcultivo y su interacción, constatando que la producción de embriones somáticos (ESs) alcanzó su máxima

eficiencia a las seis semanas de establecido el experimento, en los tres tratamientos probados, encontrando que la combinación RCV₁ indujo el valor más alto con un promedio de ESs 425.75 inducidos; RCV₂ mostró la menor capacidad multiplicativa, produciendo 202.75 ESs en promedio. Sin embargo, RCV₃, que contenía solamente una citocinina y una auxina, produjo en promedio 275.5 ESs a las seis semanas de cultivo (Figura 5); a las cuatro semanas de cultivo, se observó una menor producción de embriones somáticos, con promedios de 311, 172 y 245.75 ESs en RCV₁, RCV₂ y RCV₃, respectivamente.

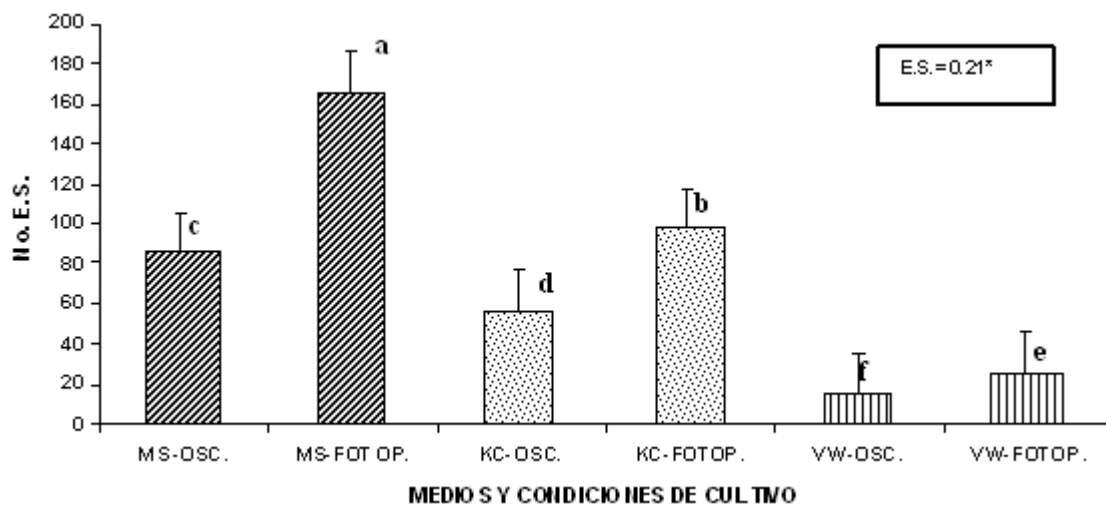


Figura 4. Efecto del medio de cultivo (MS, KC, VW) y las condiciones de incubación de oscuridad y fotoperiodo de 16/8 h ($33,78 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) sobre la proliferación de embriones somáticos.

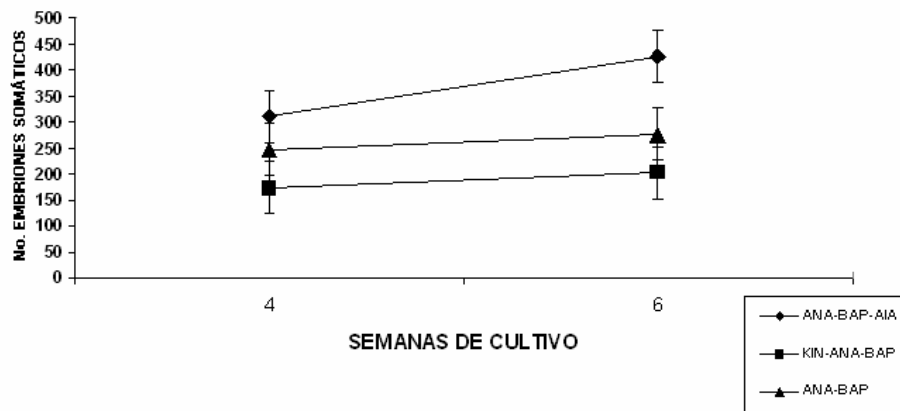


Figura 5. Comportamiento del índice de multiplicación de los embriones somáticos de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii* desarrollados en el medio MS adicionado con tres combinaciones de reguladores de crecimiento: RCV₁=MS+ANA,BAP,AIA; RCV₂=MS+KIN,ANA,BAP; RCV₃=MS+ANA,BAP, a las cuatro y seis semanas de su desarrollo *in vitro*. Los valores son las medias + ES (Error Standard).

En todos los casos, se observó un descenso en el índice de multiplicación, una vez alcanzado el nivel óptimo, ya que los embriones somáticos inician el proceso de conversión a plántula por carecer del subcultivo a medio fresco lo cual provoca la inhibición del proceso de multiplicación, activando su germinación.

Se pudo constatar que el medio de cultivo MS resultó mejor para inducir la proliferación de embriones somáticos a partir del callo embriogénico inicialmente establecido en contraste con los medios KC y VW aunque el período de tiempo en que se logra la máxima proliferación fue el más prolongado, de 8 semanas (Figura 6); sin embargo, con el medio KC también se logró inducir proliferación, lo cual podría ser suficiente para el inicio, ya que se trata de un medio menos complejo.

Efecto de los subcultivos sobre la multiplicación de los embriones somáticos

Los embriones somáticos que fueron sometidos a diferentes intervalos de subcultivo, mostraron incremento al final del tercer subcultivo; esta tendencia fue observada (21, 30 y 45 días) cuando los subcultivos se realizaron a intervalos de 45 días. Posteriormente se observó un sensible descenso en la multiplicación de los embriones somáticos, en el recuento efectuado a los 90 días sin subcultivos sucesivos.

El análisis de varianza de los resultados

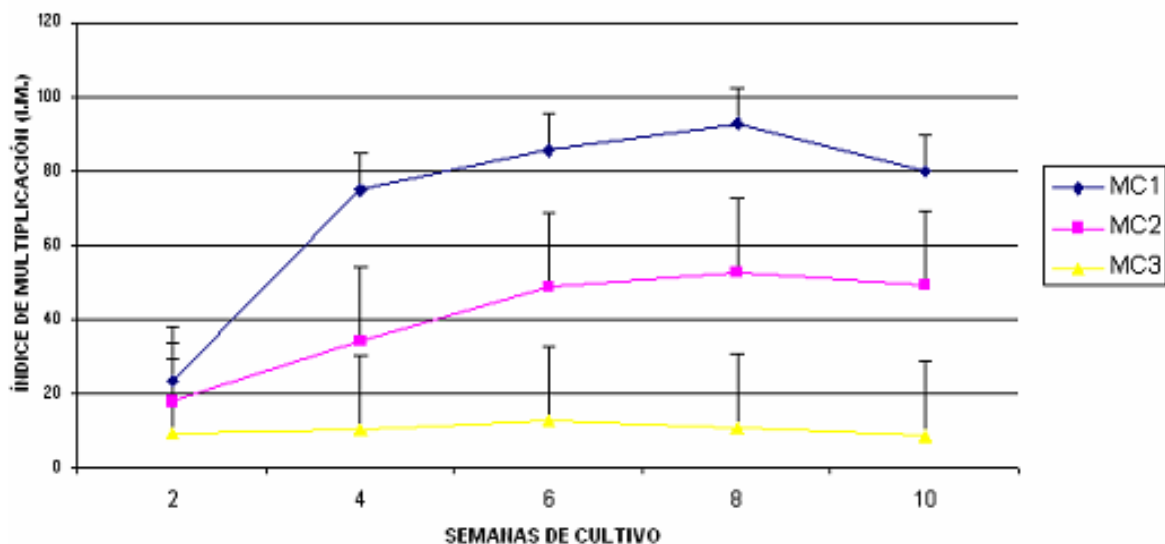


Figura 6. Cinética de multiplicación de embriones somáticos (promedios de producción de embriones somáticos) de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii* en tres medios de cultivo (MC₁: MS; MC₂: KC; MC₃: VW) a las 8 semanas de su desarrollo *in vitro*.

obtenidos, mostró diferencias significativas entre el tiempo de subcultivo y el número de subcultivos realizados, con un promedio total de de 524 ESs producidos durante los tres subcultivos, a intervalos de 45 días (Figura 7 A); asimismo, fue posible detectar diferencias significativas en el número de subcultivo efectuado, obteniendo 611 ESs, como el mayor promedio de multiplicación, en el tercer subcultivo (S3), al cabo de 135 días de desarrollo *in vitro* (Figura 7 B).

Regeneración de plantas

Los embriones somáticos formados en la superficie del callo continuaron su desarrollo, produciendo brotes y raíces (Figura 8 A), y se convirtieron en plantas completas en el medio gelificado de Vacin & Went (VW), suplementado con (mg L⁻¹): BAP (2.0), AIA (1.0), myo-inositol (100), sacarosa (30 000), carbón activado (2 000), 5 mL L⁻¹ de solución de vitaminas de MS. Después de 3 meses en cultivo, las plántulas de aproximadamente 4 cm de altura, mostrando brotes y raíces desarrollados (Figura 8 B), fueron trasplantadas al invernadero con un 95 % de sobrevivencia (Figura 8 C).

DISCUSIÓN

El manejo adecuado de los factores involucrados en este estudio, permitió el desarrollo de un protocolo inicial para la producción de embriones somáticos, que posteriormente se desarrollaron en plantas completas.

Las condiciones de incubación influyeron en el desarrollo de los callos embriogénicos, observándose pequeños y blanquecinos, particularmente los que se formaron en el medio VW, bajo condiciones de oscuridad, sin superar los 4 mm de diámetro. Fehér, *et al.* (2003), reporta que existen interacciones importantes entre los medios de cultivo, lo cual coincide con nuestros resultados, ya

que el medio de cultivo KC, bajo las mismas condiciones, indujo un callo más desarrollado, de 5-8 mm de diámetro promedio y coloración verde tenue, al igual que los ESs formados bajo la misma condición de oscuridad y sobre el medio MS, los que mostraron la misma coloración verde tenue observada en el medio KC, pero un mejor desarrollo del callo, cuyo diámetro promedio fue mayor a 8 mm. Bajo

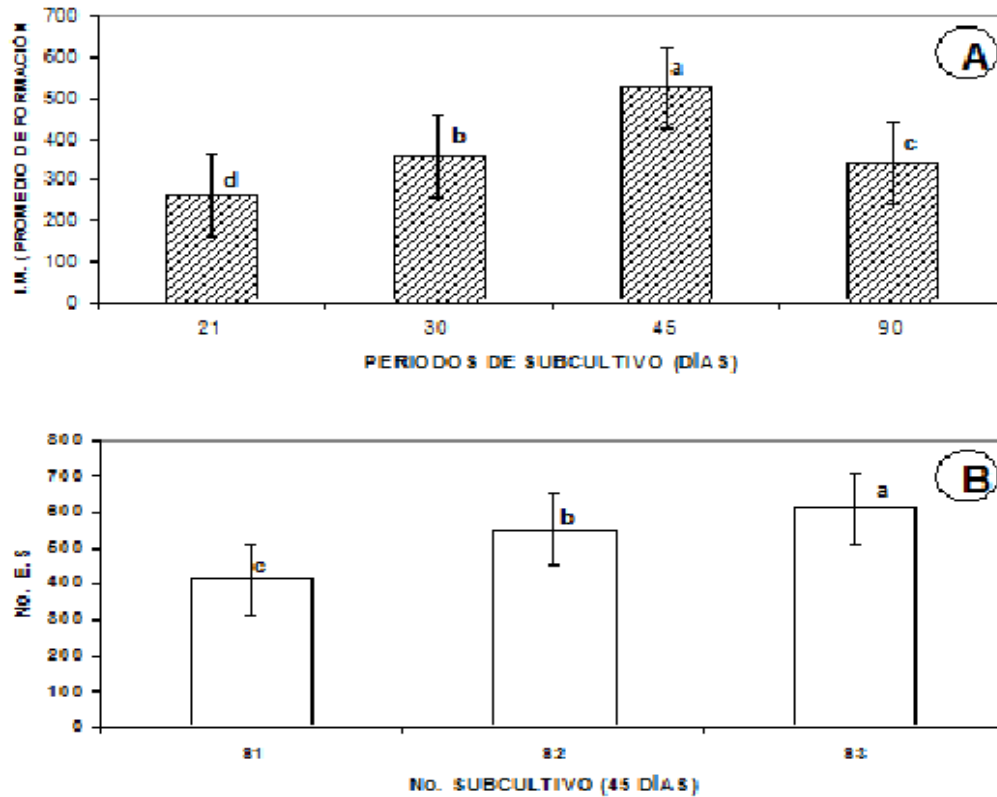


Figura 7. Efecto de tiempos de subcultivo sobre la capacidad multiplicativa de embriones somáticos de *L. anceps* ssp. *dawsonii*: A) promedio del número de embriones somáticos producidos en cuatro diferentes tiempos de subcultivo: 21, 30, 45 y 90 días; B) multiplicación de embriones somáticos a intervalos de 45 días, durante tres subcultivos sucesivos (135 días).

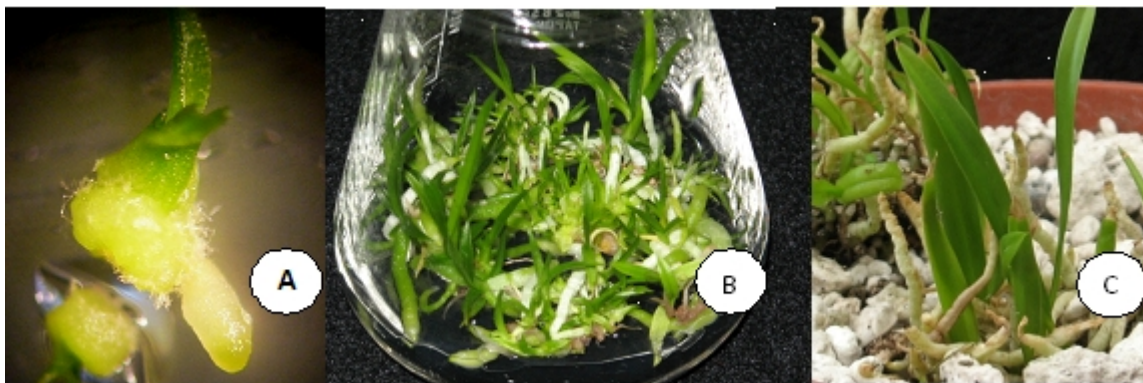


Figura 8. Regeneración de plantas a partir de cultivo de callos embriogénicos de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*: A) embrión somático mostrando su conversión a planta mediante el desarrollo de brote y raíz; B) plantas completas regeneradas *in vitro*; C) Plantas enmacetadas creciendo en peat-moss y piedra volcánica en el invernadero.

condiciones de iluminación, en todos los casos se pudo observar un mejor desarrollo, tanto en diámetro de callo y número de embriones somáticos regenerados, como en el aspecto de los mismos, vigorosos y de color verde fuerte, que se desarrollaron de manera normal, sin requerir de subcultivos a medio fresco.

Las hormonas son los candidatos más viables en la regulación de señales del desarrollo. Las auxinas y las citocininas son los principales reguladores del crecimiento en plantas, involucradas en la regulación de la división y diferenciación celular. De acuerdo a Dudits *et al.*, 1991, el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) es la auxina exógena preferencial para la inducción de embriogénesis somática. Sin embargo, el desarrollo embriogénico ha sido reportado en ausencia de reguladores del crecimiento (Choi *et al.*, 1998) así como en presencia de otros reguladores del crecimiento, tales como las citocininas (Sagare *et al.*, 2000), y de otro tipo de auxinas como el AIA, el cual en concentraciones relativamente altas (1–2 mg L⁻¹) ha mostrado estar asociado con el incremento en la respuesta embriogénica de varias especies vegetales (Rajasekaran *et al.*, 1987); en *Oncidium* (Orchidaceae) Cheng y Chang (2000) reportaron el uso de dosis desde 3 hasta 10 mg L⁻¹ de 2,4-D en combinación con TDZ (1-phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)-urea) para inducir callo embriogénico y posteriormente ANA (ácido naftalén-acético) en combinación con TDZ, en explantes de hoja y ápices de raíz, para promover la formación de embriones somáticos a partir del callo; en contraste, los resultados obtenidos en nuestro trabajo, utilizando las auxinas ANA y AIA en combinación con las citocininas BAP y Kin, mostraron la posibilidad de inducir callo embriogénico y la posterior regeneración y proliferación de embriones somáticos en *L. anceps* ssp. *dawsonii* (Orchidaceae).

En general, la utilización de BAP con las auxinas ANA y AIA, indujo la mejor respuesta tanto a la inducción de morfogénesis como a la multiplicación eficiente de embriones somáticos, ya que al utilizar las citocininas BAP y Kin en combinación con una sola auxina (ANA), esta mayor dosis de citocininas provocó una muy marcada disminución del índice de multiplicación y la morfogénesis de los callos con una pobre respuesta a la inducción, lo que demuestra el hecho de que un balance hormonal tanto a favor de las auxinas como de las citocininas, resulte adecuado para la

multiplicación de los ESs, en la especie estudiada, puede deberse a que las células de la periferia de la semilla son las que responden para diferenciarse, formar callo y luego dar lugar a la formación de los embriones somáticos. Así, el crecimiento del explante hacia cualquier sentido, provocado por la acción de las auxinas a nivel celular, provee un área mayor de tejido, capaz de reaccionar al proceso de inducción y formación de ESs. Estos resultados van de acuerdo con las observaciones de Seeni y Latha (1992) quienes reportaron que altas concentraciones de citocininas en el medio de iniciación y de multiplicación, pueden inhibir el enraizamiento. Por su parte, George y Sherrington (1984), también observaron que, los elevados niveles endógenos de citocininas en algunas especies inhiben el enraizamiento, por lo que se requiere de varios subcultivos sin concentraciones altas de citocininas a fin de reducirlos y suprimir el bloqueo que ejerce su efecto. Por otra parte, es importante señalar que en nuestro caso, los ESs no presentaron problema para la activación y desarrollo del ápice radical y el ápice caulinar, obteniéndose la maduración y conversión de los embriones somáticos en plántulas completas, cuando se cultivaron en el medio de cultivo para multiplicación (MS suplementado con ANA, BAP, AIA 2 mg L⁻¹ de cada uno), después de 45 días de iniciado el subcultivo, e incubado en fotoperiodo de 16/8 h. Martin (2003), trabajando en la propagación clonal de *Ipea malabárica* (Reichb. f.) J. D. Hook, una orquídea silvestre amenazada, endémica de la India y Sri Lanka, obtuvo resultados similares, reportando la inducción de raíces fuertes y carnosas cuando las plántulas permanecían en el medio de proliferación múltiple.

CONCLUSIONES

Se logró un mayor índice de Multiplicación de los callos embriogénicos de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii* con la combinación de reguladores de crecimiento ANA, BAP y AIA, 2 mg L⁻¹ de cada uno, en el medio de cultivo MS.

Bajo condiciones de fotoperiodo de 16/8 h se indujo morfogénesis en las semillas, que formaron callos embriogénicos, que proliferaron y regeneraron embriones somáticos cuando se realizan tres subcultivos sucesivas a intervalos de 45 días. El papel de las auxinas en mayor número adicionadas al medio de cultivo es importante para el control de la morfogénesis de los callos, promoviendo positivamente. Esta combinación de reguladores de

crecimiento en el medio MS, permite además la maduración y conversión de embriones somáticos en plántulas completas, eliminando la necesidad de realizar la fase de enraizamiento *in vitro* de la micropropagación. Estos resultados integran un protocolo inicial para la regeneración de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*, relativamente rápido y no implica el uso de medios de cultivo muy diversos, simplificando un sistema de inducción de proliferación de embriones somáticos a partir de semillas.

La regeneración de plantas del callo a través de embriones somáticos en *Laelia anceps* ssp. *dawsonii* puede ser útil para estudios posteriores, previa caracterización del proceso embriogénico y con el objetivo de eficientizar el proceso de micropropagación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a Antonio Bustos Melgarejo, por proporcionar las plantas de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii* fuente de explantes en este estudio, y a la Universidad Veracruzana por el soporte financiero para la realización del presente trabajo.

LITERATURA CITADA

- Avila, I. y R. Salgado. 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de Hidalgo (Ed.). 8:138-149.
- Bechtel, P. G. 1990. The Laelias of México. American Orchid Society Bulletin. 59(12):1229-1234.
- Cheng, J. T. and W. C. Chang. 2004a. Induction of repetitive embryogenesis from seed-derived protocorms of *Phalaenopsis amabilis* var. Formosa Shimadzu. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 40:290-293.
- Cheng, J. T. and W. C. Chang. 2004b. TIBA affects the induction of direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Oncidium*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 79:315-320.
- Cheng, J. T. and W. C. Chang. 2003. Effects of GA₃, ancymidol, cycocel and paclobutrazol on direct somatic embryogenesis of *Oncidium in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 72:105-108.
- Cheng, J. T. and W. C. Chang. 2000. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae). Plant Science 160:87-93.
- Choi, Y. E.; D. C. Yang; J. C. Park; W. Y. Soh and K. T. Choi. 1998. Regenerative ability of somatic single and multiple embryos from cotyledons of Korean ginseng on hormone-free medium. Plant Cell Rep. 17:544-551.
- Dudits, D.; L. Bögre and J. Györgyey. 1991. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. J. Cell Sci. 99:475-484.
- Fehér, A.; T. P. Pasternak and D. Dudits. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74:201-228.
- George, E. F. and P. D. Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture. Exegetics Ltd. Eversley, England. 1333 p.
- Halbinger, F. 1993. *Laelias* de México. Asociación Mexicana de Orquideología, A.C. (Ed.) México, D.F. 71 pp.
- Huan, L. V.; T. Takamura and M. Tanaka. 2004. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. Plant Science 166:1443-1449.
- Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seed. Am. Orchid Soc. Bull. 15: 214-217.
- Lee, Y. I. and N. Lee. 2003. Plant regeneration from protocorm-derived callus of *Cypripedium formosanum*. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 39:475-479.
- Martin, K. P. 2003. Clonal propagation, encapsulation and reintroduction of *Ipsea malabarica* (Reichb. f.) J.D. Hook., an endangered orchid. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 39:322-326.
- Martin, K. P. and A. K. Pradeep. 2003. Simple strategy for the *in vitro* conservation of *Ipsea*

- malabarica* an endemic and endangered orchid of the Western Ghats of Kerala, India. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 74:197-200.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15:473-497.
- Murthy, H. N. and A. N. Pyati. 2001. Micropropagation of *Aerides maculosum* Lindl. (Orchidaceae). *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 37:223-226.
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001.2002. Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres: Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio: Lista de especies en riesgo. Diario Oficial (6 de marzo 2002), México, D.F.
- Piven, N. M.; F. A. Barredo Pool, I. C. Borges Argáez, M. A. Herrera Alamillo, A. Mayo Mosqueda, J. L. Herrera and M. L. Robert. 2001. Reproductive biology of henequén (*Agave fourcroydes*) and its wild ancestor *Agave angustifolia* (Agavaceae). I. Gametophyte development. *American Journal of Botany*. 88(11):1966-1976.
- Potisek, M. C.; M. Sarmiento y L. N. Puc. 1996. Germinación de semillas y su establecimiento *in vitro* de *Laelia rubescens* Lindley y *Epidendrum stamfordianum* Batem. INIFAP. CIR-SURESTE (Eds.) Campeche, Camp. México. 1:187-192.
- Rajasekaran, K; M. B. Hein; G. C. Davis, M. G. Carnes and I. K. Vasil. 1987. Exogenous growth regulators in leaves and tissue cultures of *Pennisetum purpureum* Schum. *J. Plant Physiol*. 130:13-25.
- Rao, A. T. 1998. Conservation of wild orchids of Kodagu in the Western Ghats. Bangalore: The Technology Development and Agricultural Technologies and Services Pvt. Ltd.; 242 p.
- Sagare, A. P.; Y. L. Lee, T. C. Lin, C. C. Chen and H. S. Tsay. 2000. Cytokinin-induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Corydalis yanhusuo* (Fumariaceae) – a medicinal plant. *Plant Sci*. 160:139-147.
- Santos Hernández, L.; M. Martínez García; J. E. Campos and E. Aguirre León. 2005. *In vitro* Propagation of *Laelia albida* (Orchidaceae) for Conservation and Ornamental Purposes in México. *HortScience* 40(2):439-442.
- SAS System. 1989–1997. Version 6.12, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Seeni, S. and P. G. Latha. 1992. Foliar regeneration of the endangered Red Vanda, *Renanthera imschootiana* Rolfe (Orchidaceae). *Plant-Cell-Tissue-Organ-Culture* 29(3):167-72.
- Shimura, H. and Y. Koda. 2004. Micropropagation of *Cyrtopodium macranthos* var. *rebunense* through protocorms-like bodies derived from mature seeds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 78:273-276.
- Soto Arenas, M. A. 1993. Clasificación infraespecífica de *Laelia anceps*. *Orquídea* (Méx.) 11:233-277.
- STATISTICA. 1998. STAT SOFT, Inc. Statistica for Windows. Version 5. (Computer program manual). Statistica: user guide. 2325 East 13th Street, Tulsa, Ok. 74104. USA.
- Steel, R. G. and J. H. Torrie. 1980. Principles and Procedures of Statistics a Biometrical Approach. 2nd Mc Graw Hill (Eds.). New York. 633 p.
- Vacin, E. F. and F. W. Went. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. *Botanical Gazette*, 110: 605-613.