

**SALES MINERALES Y REGULADORES DE CRECIMIENTO EN MEDIOS DE CULTIVO
PARA DESARROLLO DE *Myrmecophila grandiflora***

**[MINERAL SALTS AND GROWTH REGULATORS IN THE CULTURE MEDIA FOR
DEVELOPMENT OF *Myrmecophila grandiflora*]**

**Ilse Lizbeth Chavez-Cruz¹, José Raymundo Enríquez-del Valle^{1§}, Ernesto Hernández-Santiago¹,
Gerardo Rodríguez-Ortiz¹**

¹Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. Laboratorio de Micropropagación. Ex hacienda de Nazareno, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca. México.

[§]Autor para correspondencia: (jose.ev@voaxaca.tecnm.mx).

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue evaluar diferentes concentraciones de N6-benzylaminopurina (BAP), 6-furfurylaminopurina (Kinetina) y ácido indol-3-acético (AIA), el tipo de sales minerales Knudson o Murashige y Skoog, en su efecto en el desarrollo *in vitro* de plantas de *M. grandiflora* (Orquidaceae). Plántulas de *M. grandiflora* se transfirieron a recipientes de 145 cm³ que contenían 20 ml de diferentes medios de cultivo que variaron en la composición de sales inorgánicas y reguladores de crecimiento. Al inicio del experimento las plantas tuvieron de 2.7 a 3.9 hojas, de 0.6 a 0.7 cm de altura, de 0.4 a 0.6 de brotes y 1.4 a 2.5 de raíces. Transcurridos los 120 días de incubación las plantas mostraron diferencias de crecimiento de 3.2 a 4.3 hojas, de 0.8 a 1.3 cm de altura, de 1.2 a 3.14 de raíces y de 1.9 a 3.14 brotes. El uso del medio de cultivo con sales inorgánicas Knudson al 100% combinado con 0.5 mg l⁻¹ de BAP + 0.5 mg l⁻¹ kin + 0.5 mg l⁻¹ AIA, promovió el mejor crecimiento de raíces, mientras que al aumentar la dosis de AIA a 1 mg l⁻¹, las plantas crecieron más en altura. Las plantas establecidas en medio de cultivo con sales inorgánicas MS al 100% en combinación 0.5 mg l⁻¹ de BAP + 0.5 mg l⁻¹ kin + 1 mg l⁻¹ AIA, formaron más hojas.

Palabras clave: AIA, BAP, germinación, *in vitro*, kinetina, plántulas.

ABSTRACT

The objective of the research was to evaluate different concentrations of N6-benzylaminopurine (BAP), 6-furfurylaminopurine (Kinetin) and indole-3-acetic acid (IAA), the type of mineral salts Knudson or Murashige and Skoog, in their effect on the development *in vitro* of *M. grandiflora* (Orquidaceae) plants. Seedlings of *M. grandiflora* were transferred to 145 cm³ containers containing 20 ml of different culture media that varied in the composition of inorganic salts and growth regulators. At the beginning of the experiment, the plants had 2.7 to 3.9 leaves, 0.6 to 0.7 cm in height, 0.4 to 0.6 shoots and 1.4 to 2.5 roots. After 120 days of incubation, the plants showed growth differences of 3.2 to 4.3 leaves, 0.8 to 1.3 cm in height, 1.2 to 3.14 roots and 1.9 to 3.14 shoots. The use of the culture medium with 100% Knudson inorganic salts combined with 0.5 mg l⁻¹ of BAP + 0.5 mg l⁻¹ kin + 0.5 mg l⁻¹ IAA, promoted the best root growth, while increasing the dose of IAA at 1 mg l⁻¹, the plants grew taller. Plants established in culture medium with 100% MS inorganic salts in combination 0.5 mg l⁻¹ of BAP + 0.5 mg l⁻¹ kin + 1 mg l⁻¹ IAA, formed more leaves.

Index words: IAA, BAP, germination, *in vitro*, kinetin, seedlings.

INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae es de las monocotiledóneas que incluye mayor cantidad, 25,00 especies en el mundo (Yeung, 2017). Es una familia cosmopolita que alcanza su mayor diversidad en las regiones tropicales, encontrándose la mayor cantidad de especies en América tropical (Soto y Salazar, 2004). Estas especies se consideran importantes por ser indicadoras de estabilidad de los ecosistemas, además de su importancia comercial por el aroma y apariencia de sus flores, el cual ha provocado la continua extracción de ejemplares de poblaciones silvestres. Sumado a esto el deterioro de su hábitat natural ha sido un factor que ha disminuido las poblaciones de orquídeas (Gaudencio-Sedano *et al.*, 2015). Por lo que aproximadamente 200 especies de orquídeas se consideran en alguna categoría de riesgo y se sugiere su cuidado tanto *in situ* como *ex situ* (Salazar *et al.*, 2006; Menchaca-García *et al.*, 2012).

La especie *Myrmecophila grandiflora* es una orquídea, con distribución en los estados de Veracruz, San Luis Potosí, Tamaulipas y Oaxaca (Ortiz, 2015), la que en condiciones silvestres se encuentran expuesta a factores que limitan su propagación sexual. A pesar de que producen miles de semillas, éstos son muy pequeñas y con escasas sustancias de reserva por lo que muy pocas llegan a germinar, además para su sobrevivencia depende de la relación simbiótica con hongos micorrízicos que le proporcione los nutrientes para su germinación y desarrollo (Luan *et al.* 2006; Gaudencio-Sedano *et al.*, 2015; Gil *et al.*, 2019). El cultivo *in vitro* es una técnica que permite la obtención de gran cantidad de plantas en periodo corto de tiempo, puesto que en estas condiciones germina hasta el 90 % de semillas, siendo así una estrategia para el incremento de poblaciones de orquídeas con fines de conservación o para producción comercial (Pedroza-Manríquez *et al.*, 2010; Gaudencio-Sedano *et al.*, 2015; Frausto *et al.*, 2019). Es por ello que el presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar el crecimiento de plantas de *M. grandiflora* obtenidas a partir de la germinación de semillas, que para su crecimiento se establecieron en medios de cultivo que variaron en concentración de reguladores de crecimiento, N6-benzylaminopurina (BAP), 6-furfurylaminopurina (kinetina) y ácido indol-3-acético (AIA), en combinación con sales minerales Knudson o Murashige y Skoog.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, localizado en Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México. Las plantas de *M. grandiflora* se obtuvieron a partir de la germinación de semillas, al establecerlas en frascos con 20 ml de medio de cultivo con consistencia de gel, que contenía sales minerales Knudson (1946) al 100%, 25 g l⁻¹ de sacarosa, 0.4 mg l⁻¹ de tiamina-HCl. Los cultivos se incubaron durante 270 días en condiciones de 15 a 19 °C, con luz fluorescente 35 µmol m² s⁻¹ en fotoperiodos de 16 h y 8 h oscuridad.

Posteriormente las plantas se transfirieron en algunas de las variantes de medios de cultivo que contenían: 1 mg l⁻¹ de tiamina-HCl, 25 g l⁻¹ de sacarosa, 100 mg l⁻¹ de myo-inositol, con variaciones en el tipo y concentración de sales minerales (SM): Murashige y Skoog (1962) (MS), a 33, 66 y 100%, o sales minerales Knudson (K) al 66 y 100 % de concentración; y alguna mezcla de reguladores de crecimiento (RC), N6-Benzylaminopurina (BAP), 6-furfurylaminopurina (Kin) y Ácido indol-3-acético (AIA), en tres niveles: M1= 0.5 mg l⁻¹ de BAP + 0.5 mg l⁻¹ de Kin + 0.5 mg l⁻¹ de AIA; M2= 0.5 mg l⁻¹ de BAP + 0.5 mg l⁻¹ de Kin+ 1 mg l⁻¹ AIA; M3= 0.5 mg l⁻¹ de BAP+ 0.5 mg l⁻¹ de Kin + 2 mg l⁻¹ AIA, obteniendo 15 tratamientos en total (Cuadro 1).

Para cada variante de medio de cultivo el pH se ajustó a 5.8 antes de agregar 5.7 g l⁻¹ de agar. El agar se disolvió con calor y agitación, y se vertieron 20 ml en frascos de 145 cm³, a los cuales se les colocó una tapa de polipropileno y se esterizaron en autoclave durante 17 min. Posteriormente bajo condiciones asépticas proporcionadas por una cámara de flujo laminar, y con ayuda de pinzas de

disección, bisturí y cajas de Petri de 10 x100 mm de vidrio esterilizadas, se transfirieron seis plantas a cada frasco con alguna de las variantes de medio de cultivo. Después de establecer los propágulos en cada frasco, se colocó nuevamente la tapa y se selló con polietileno adherente, y se colocaron en un cuarto de incubación, en las condiciones de iluminación y temperatura ya descritas.

Cuadro 1. Tratamientos resultantes de la combinación de los niveles del factor mezcla de reguladores de crecimiento (BA, Kinetina y AIA) y niveles del factor sales minerales (Murashige y Skoog, 1962 y Knudson, 1994).

Sales minerales	Mezcla de reguladores de crecimiento		
	M1	M2	M3
MS 100%	T1	T6	T11
MS 66%	T2	T7	T12
MS 33%	T3	T8	T13
Knudson 100%	T4	T9	T14
Knudson 66%	T5	T10	T15

M1=BAP 0.5 mg l⁻¹+ kn 0.5 mg l⁻¹+ 0.5 mg l⁻¹ AIA; M2 =BAP 0.5 mg l⁻¹+ kn 0.5 mg l⁻¹+1 AIA; M3=BAP 0.5 mg l⁻¹+ kn 0.5 mg l⁻¹+2 mg l⁻¹ AIA; T_i = tratamiento; 5x3=15 tratamientos.

Para determinar las diferencias de desarrollo de las plantas en respuesta a las variaciones de composición de los medios de cultivo, al inicio y cada 30 días, durante 120 días se registraron datos de altura de las plantas, número de hojas, número de raíces y número de brotes. El experimento se estableció de acuerdo a un diseño completamente al azar con arreglo de tratamiento factorial 5x3, cinco niveles del factor sales minerales y tres niveles del factor reguladores de crecimiento. Los datos de cada variable y fecha se sometieron por separados a análisis de varianza y comparación de medias (Tukey, $\alpha= 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el transcurso de los 120 días de incubación los análisis de varianza mostraron efectos significativos ($P\leq 0.01$) en cuanto al tipo y concentración de sales minerales para el incremento de número de hojas, altura de la planta y número de raíces. Los niveles del factor mezclas de reguladores de crecimiento (RC), tuvieron efectos diferentes altamente significativos ($P\leq 0.01$) para la variable número de raíces; mientras que la interacción de SM y RC tuvo efectos altamente significativos ($P\leq 0.01$) en la altura de la planta (Cuadro 2). De tal manera que al inicio del experimento las plantas en las diversas variantes del medio de cultivo tuvieron de 2.69 a 3.89 hojas, de 0.58 a 0.66 cm de altura de la planta, de 0.42 a 0.61 brotes y 1.39 a 2.47 raíces, en cada característica fueron magnitudes no significativamente diferentes, indicando que los grupos de plantas en los diversos tratamientos fueron homogéneos en características (Tukey, $\alpha \leq 0.05$).

Durante el tiempo de incubación las plantas establecidas en el T6 que corresponde al medio con sales inorgánicas MS al 100% + la M2 de RC, mostraron 4.25 hojas y las plantas establecidas en el medio de cultivo con las sales minerales Knudson al 66%, en que se agregó la M3 de RC, que corresponde al T15, mostraron 3.19 hojas (Figura 1A), valores que fueron diferentes significativamente (Tukey, $\alpha\leq 0.05$).

Las plantas con mayor tamaño total en altura fueron las que se establecieron en el T9, medios de cultivo con sales minerales K-100% +M2 de RC, que alcanzaron 1.29 cm, a diferencias de las plantas establecidas en el T10, con sales inorgánicas K-66%+M2 de RC, que tuvieron menor tamaño con 0.83 cm, magnitudes significativamente diferentes (Tukey, $\alpha\leq 0.5$) (Figura 2B).

Cuadro 2. Resumen de análisis de varianza de las variables número de hojas, altura, número de raíces y número de brotes de *M. grandiflora* transcurridos 120 días de incubación.

FV	Gl	Cuadrados medios y significancia			
		NH-120 días	ALT-120 días	NR-120 días	NB4-120 días
Trat.	14	0.9601*	0.1802**	16.7305**	1.5931 Ns
SM	4	2.2557**	0.5000**	47.3634**	2.3887 Ns
RC	2	0.2125 Ns	0.0462 Ns	13.6853**	0.7972 Ns
SM*RC	8	0.4991 Ns	0.0643**	2.1753 Ns	1.3943 Ns
Error	165	0.0522	0.0763		1.5209
	164			1.8127	
Total	179				

Trat= tratamiento; SM=sales minerales; RC=reguladores de crecimiento; SM*RC=interacción de SM y RC; ALT=altura; *=probabilidad >F, significativo ($p \leq 0.05$); **=probabilidad > de F, altamente significativo ($P \leq 0.01$) Ns=probabilidad > F, no significativo ($p > 0.05$); FV=fuente de variación; Gl=grados de libertad.

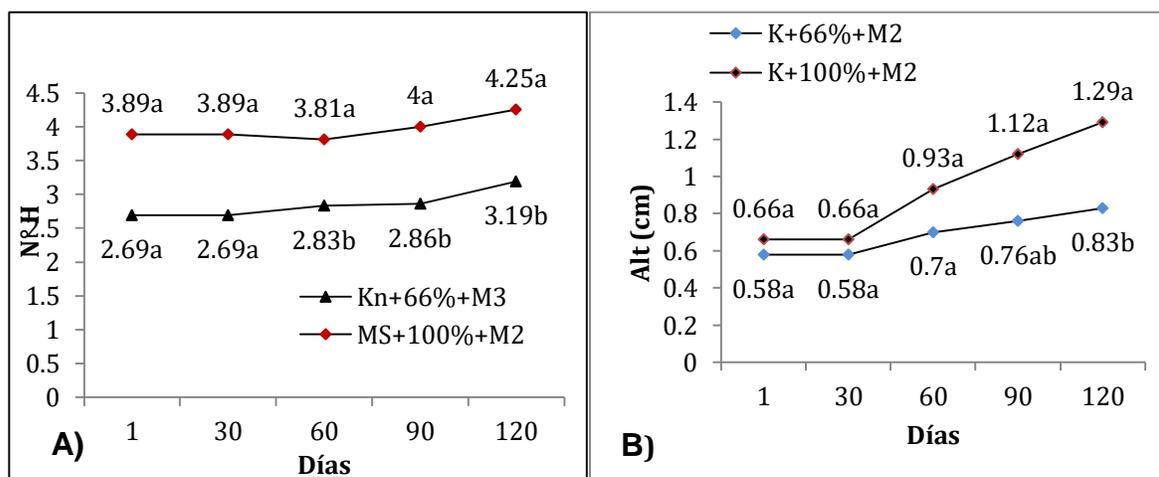


Figura 1. Respuestas de crecimiento en las variables. A. Número de hojas y B. Altura de la planta de *M. grandiflora*, cultivadas *in vitro*, en medios de cultivos con diferentes concentraciones de sales minerales y reguladores de crecimiento, en los que se obtuvo el mayor y el menor incremento respectivamente, durante el periodo febrero-mayo 2017. En cada fecha, valores con misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $\alpha \leq 0.05$).

En cantidad de raíces, las plantas establecidas en el medio Knudson al 100% en combinación con la M1 de RC (T4) desarrollaron 6.17 raíces, valor que fue significativamente mayor a los 1.17 raíces que tuvieron las plantas establecidas en el medio con las sales minerales MS al 100% más la M2 de RC (Figura 2A). Las plantas establecidas en el medio de cultivo con las sales minerales MS al 100%, combinado con la M3 de RC, y las plantas en el medio con sales minerales Knudson, combinadas con la M3 de RC, tuvieron 3.14 y 1.95 brotes, respectivamente (Figura 2B), valores significativamente diferentes (Tukey, $\alpha \leq 0.05$).

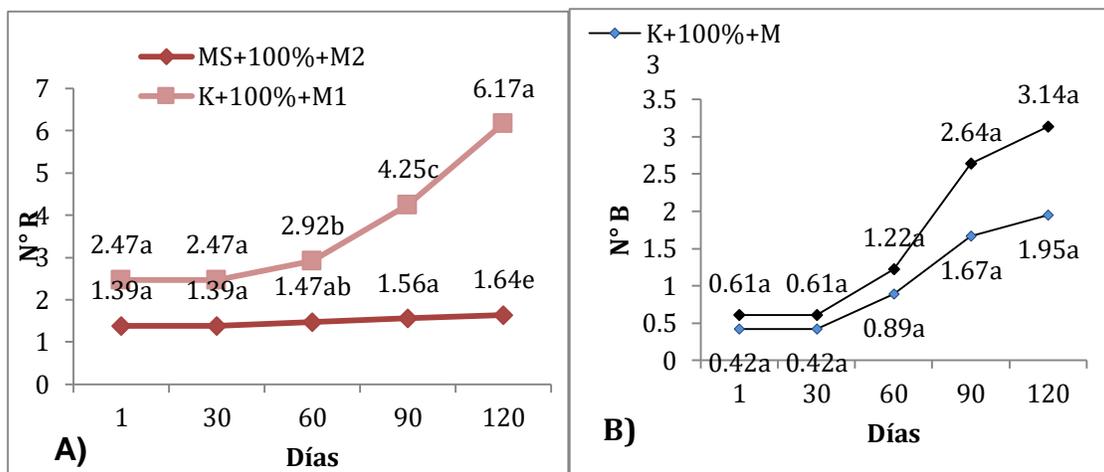


Figura 2. Respuestas de crecimiento en las variables. A. Número de raíces y B. Número de brotes de *M. grandiflora*, cultivadas *in vitro*, en medios de cultivos con diferentes concentraciones de SM y RC, en los que se obtuvo el mayor y el menor incremento respectivamente, durante el periodo febrero-mayo de 2017. En cada fecha, valores con misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $\alpha \leq 0.05$).

En cuanto al incremento de las diferentes variables, los análisis de varianza mostraron que para la variable número de hojas, altura de la planta y número de raíces, el factor SM mostró efectos altamente significativos ($P \leq 0.01$), en incremento en número de hojas (INH), incremento en altura (IALT), e incremento en número de raíces (INR), mientras que el factor RC se mostraron valores significativos ($P \leq 0.05$) en el incremento en número de hojas (INH) e incremento en número de raíces (INR) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Análisis de varianza para el incremento de número de hoja, número de raíces, número de brotes y altura de la planta de *M. grandiflora*.

FV	GL	Cuadrados medios y significancia			
		INH	IALT	INR	INB
Trat.	14	0.8874*	0.1405 **	12.1782**	1.3297Ns
SM	4	1.9298**	0.3367 **	37.5897**	2.5374Ns
RC	2	1.6060*	0.0425Ns	5.7526*	0.9501Ns
SM*RC	8	0.1866 Ns	0.0670Ns	1.0789Ns	0.8207Ns
Error	160	0.4801	0.0492	1.4272	1.3410
Total	179	0.8874	0.1405	12.1782	1.3297

Al comparar el efecto entre los tratamientos para determinar el incremento de las plantas en la cantidad de hojas, número de raíces, número de brotes y altura de la planta, se pudo determinar que el medio de cultivo que contenía, Knudson al 100% combinada con $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ BAP + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ kin + $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ AIA fue mejor condición para el desarrollo de las plantas en comparación con el medio de cultivo que contenía sales MS al 100% combinada con $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ BAP + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ kin + $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ AIA, en donde las plantas mostraron los menores incrementos, en las variables mencionadas (Figura 3).

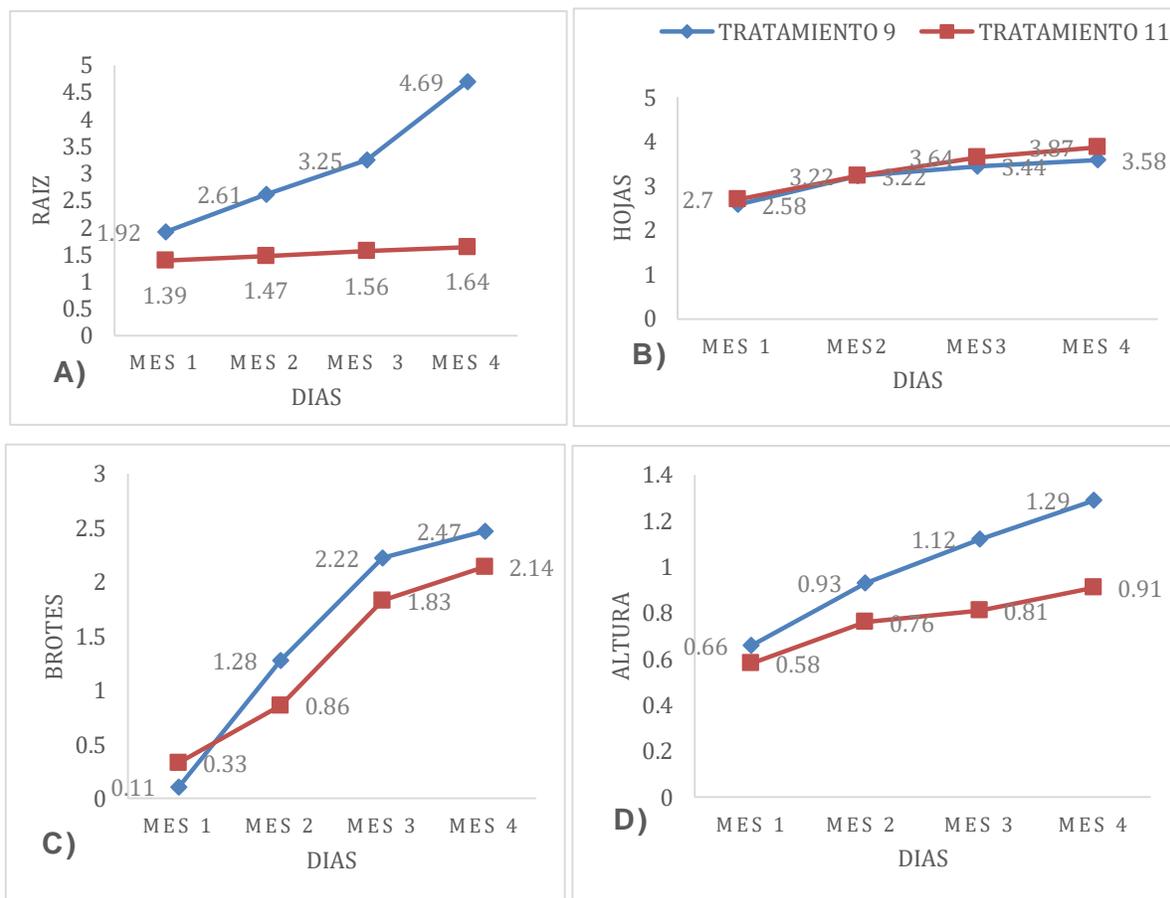


Figura 3. Incremento de las variables: A. Número de raíces. B. Número de hojas. C. Número brotes. D. Altura de las plantas de *M. grandiflora* establecidas en los tratamientos 9 y 11 en cada fecha. Valor con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $\alpha \leq 0.05$)

En el presente experimento se evaluaron las sales minerales MS a diferentes concentraciones (100, 66 y 33%) en combinación con tres reguladores de crecimiento 6-benzylaminopurina (BAP), 6-furfurylamino purina (Kinetina) y ácido indol-3-acético (AIA), se obtuvo que las sales minerales en interacción con los reguladores de crecimiento si influyeron en la organogénesis de *M. grandiflora*.

En el cultivo *in vitro* de orquídeas se tienen antecedentes del uso de diversas formulaciones de sales minerales con fines de propagación. Coello *et al.* (2010) desarrollaron un procedimiento de cultivo *in vitro* para inducir brotes y raíces en las plántulas de *Guarianthe skinneri* regeneradas a partir de protocormos derivados de semillas en un medio de Murashige y Skoog (MS) complementado con 6-benziladenina (BA), ácido indol-3-acético (AIA), ácido naftalenacético (ANA) y ácido giberélico (GA3). Obtuvieron un máximo de 10.6 brotes con 16.1 μM de ANA, 17.1 μM de AIA, 6.3 x 10⁻⁹ μM de GA3 y 0.0023 μM de BA. Un máximo de 4 raíces en cada brote se obtuvo con 5.4 μM de ANA, 17.1 μM de AIA, 0.001 μM de AG3 y 4.6 x 10⁹ μM de BA.

En el presente experimento se evaluaron también las sales minerales MS a diferentes concentraciones (100, 66 y 33%) en combinación con tres reguladores de crecimiento 6-benzylaminopurina (BAP), 6-furfurylaminopurina (Kinetina) y ácido 3-indolacético (AIA), se obtuvo que las sales minerales y los reguladores de crecimiento si influyeron independientemente en la organogénesis de *M. grandiflora*. Se obtuvo un total de 3.14 brotes en el medio MS al 66 % combinado con 0.5 mg·l⁻¹ BA, 0.5 mg l⁻¹ Kin y 2 mg·l⁻¹ de AIA, 4.25 hojas en medio MS al 100% combinado con 0.5 mg l⁻¹ BA, 0.5 mg l⁻¹ Kin y 1 mg·l⁻¹ de AIA. Mientras que el medio de cultivo Knudson al 100% combinado con 0.5 mg·l⁻¹ de BA, 0.5 mg·l⁻¹ Kin, 0.5 mg l⁻¹ AIA resultó mejor condición para que las plantas formaran más raíces. En los propágulos establecidos en el medio de cultivo con 0.5 mg·l⁻¹ BA, 0.5 mg·l⁻¹ Kin y 1 mg l⁻¹ de AIA se obtuvo mejor incremento en altura con 1.29 cm y mayor número de raíces. Lo anterior coincide con Barba (1997) y Soonthornkalump *et al.* (2019) quienes mencionan que el balance auxina-citocinina es un factor muy importante en la regulación del crecimiento por alargamiento o por división celular.

Así mismo, Flores-Hernández *et al.* (2017), reportan que para el desarrollo de brotes adventicios de *Laelia anceps* Lindl y *Epidendrum* sp., que se establecieron en medio de cultivo con diferentes concentraciones de sales MS (50 y 100%) y ácido giberílico (0 y 1 mg l⁻¹), se obtuvieron mejores respuestas en la longitud de brotes y número de raíces en brotes establecidos en medios MS al 50% con AG₃, mientras que Wida *et al.* (2017) obtuvieron el 100% de germinación de semillas y 84% de formación de brotes de *Dendrobium lasianthera* en medios VW suplementado con 2 g l⁻¹ de peptona, con un promedio de 6.0 brotes.

Para la germinación de semilla de *Vanilla planifolia* se logró mejor respuesta en el medio de cultivo Knudson B a una concentración de una décima parte del original. El efecto de la concentración de la solución nutritiva, solución B de Knudson que contenía las sales minerales y el azúcar se comparó con diluciones de ésta con agua destilada. Se compararon tres concentraciones relativas de Solución B (0.10, 0.25, y solución B normal). Cuando se hicieron las observaciones finales, se encontró que, al reducir la concentración de la Solución B a una décima parte de su concentración normal, el 49% de las semillas germinó, que fue superior en comparación al 10.3% de semillas que germinaron en el medio de cultivo a concentración normal (Lugo-Lugo, 1955).

En el presente trabajo se muestra que la concentración de sales minerales es importante para el crecimiento de los propágulos, en donde el tratamiento T4, que contenían las sales minerales Knudson al 100% de concentración, combinada con 0.5 mg l⁻¹ de BA, 0.5 mg l⁻¹ Kin, 0.5 mg l⁻¹ AIA resultó mejor condición para obtener mayor cantidad de raíces, mientras que en el T9 fue mejor condición para el crecimiento en altura, con 0.5 mg l⁻¹ BA, 0.5 mg l⁻¹ Kin y 1 mg l⁻¹ de AIA, en donde los propágulos de *M. grandiflora* tuvieron incremento promedio de 1.29 cm. Por su parte Seon *et al.* (2018) indican que los resultados de diversos trabajos con orquídeas demuestran que las respuestas observadas dependen de la especie con la cual se trabaje, y la composición del medio de cultivo.

Los datos obtenidos mostraron que las plantas de *M. grandiflora* que se establecieron en medios de cultivo con sales minerales Knudson lograron mayor crecimiento que las plantas que se establecieron en medio de cultivo con las sales MS, por lo que se demuestra que la concentración de sales minerales y no solo reguladores de crecimiento y otros compuestos, es un factor importante a evaluar cuando se busca mejorar el crecimiento de cultivos *in vitro*. Por lo anterior, se está de acuerdo con Morard *et al.* (1998) quienes al propagar la *Catharanthus roseus*, compararon el efecto de los medios modificados de

Murashige y Skoog (MS): el medio MS ½ semidiluido (VII) tenía una concentración de iones global de 49.6 meq l⁻¹ y el medio MS enriquecido con 170 mg NaH₂PO₄ l⁻¹ (VIII) tenía una concentración total de iones que alcanzaba tan alto 101.6 meq l⁻¹. Se obtuvo que el medio MS diluido fue más adecuado que el medio MS completo, debido a que la concentración total de iones del medio MS fue demasiado alta para el desarrollo óptimo de los cultivos *in vitro*.

Así mismo, Dulić *et al.* (2019) probaron dos medios basales Knudson C(KC) y Malmgren (MM) y citoquininas en cultivos *in vitro* de *Himantoglossum jankae* y *Spiranthes spiralis*, obteniendo como resultado el mejor desarrollo de plántulas de las dos especies en medio de cultivo Malmgren que contiene bajas concentraciones de sales inorgánicas. Para *S. spiralis* se obtuvieron mayor crecimiento en altura, y número de hojas en brotes establecidos en medio de cultivo Malmgren suplementado con 0.6 mg l⁻¹ de kinetina mientras que para *H. jankae* solo tuvo efecto positivo en altura y para la formación de raíces para esta segunda especie fue mejor el medio de cultivo MM suplementado con 6-bencilaminopurina. Por lo que la importancia de los macronutrientes presentes en el medio de cultivo, así como su composición puede tener efectos importantes en el desarrollo de cultivos *in vitro* y micropropagación de diversas especies (Morard *et al.*, 1998).

En cuanto a la función de los reguladores de crecimiento, en especies de *P. citrina* el desarrollo organogénico a partir de protocormos *in vitro*, se obtuvieron 6.75 brotes por explantes establecidos en medios de cultivo MS con la concentración de BAP 1.0/ANA 0.15 mg l⁻¹, y la adición en bajas concentraciones de BAP promovió el incremento de tamaño de hojas y raíces de los brotes (Cazarez *et al.*, 2016). Enríquez-del Valle *et al.* (2005) evaluaron el enraizado de brotes de *A. angustifolia* al establecerlos en medio de cultivo con las sales MS en diferentes concentraciones (100, 75 y 50%) en donde los brotes establecidos en medio con las sales MS 75 o 50% y sin fitohormonas, formaron mayor cantidad de raíces adventicias, en comparación a los brotes que se establecieron en medio de cultivo con las sales minerales al 100% de concentración. Al adicionar ácido indol-3-acético (AIA) o ácido indolbutírico (AIB) en el medio, los brotes formaron raíces en mayor cantidad. Por otra parte, Miguel-Luna *et al.* (2013) indican que el medio de cultivo con las sales minerales a 66% de concentración fue mejor condición que las sales al 100% para que los brotes de *Agave americana* formaran mayor cantidad de raíces adventicias.

CONCLUSIONES

Durante el cultivo *in vitro* de *M. grandiflora*, el uso del medio de cultivo con sales inorgánicas Knudson al 100% combinado con 0.5 mg l⁻¹ de BAP + 0.5 mg l⁻¹ kin + 0.5 mg l⁻¹ AIA, promovió la formación de mayor cantidad de raíces, mientras que al aumentar la dosis de AIA a 1 mg l⁻¹, las plantas crecieron más en altura. Por otra parte, las plantas que se establecieron en medio de cultivo con sales inorgánicas MS al 100% combinado con 0.5 mg l⁻¹ de BAP + 0.5 mg l⁻¹ kin + 1 mg l⁻¹ AIA, mostraron superior incremento de hojas

LITERATURA CITADA

- Barba, A.A. 1997. Reguladores de crecimiento vegetal. En: Hurtado, M.D. y Merino, M.M. Cultivo de tejidos vegetales. Trillas. México, D.F. pp. 48-66.
- Cazarez, F.T.L., J.J. Graciano Luna, S. Solís González, B. Díaz Ramírez, J.A. Nájera Luna y J.B. Montoya Ayón. 2016. Propagación *in vitro* de la orquídea *Prosthechea citrina* (La Llave and Lex.) W.E. Higgins nativa del estado de Durango, México Investigación y Ciencia. 24(67):19-25.
- Coello, C.Y., C.L. Miceli, C. Orantes, L. DenDooven and F.A. Gutiérrez. 2010. Plant growth regulators optimization for *in vitro* cultivation of the orchid *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressier and W.E. Higgins. Gayana Botanica. 67(1):19-26.
- Dulić, J., M. Ljubojević, V. Ognjanov, G. and T. Dulić. 2019. *In vitro* germination and seedling development of two European orchid species, *Himantoglossum jankae* Somlyay, Kreutz-Óvári and *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*.
- Enríquez-del Valle, J.R., G. Carrillo-Castañeda y J.L., Rodríguez-de la O. 2005. Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia* Revista fitotecnia mexicana. 28(2):175-178.
- Flores-Hernández, L.A., A. Robledo-Paz y M.J. Jimarez-Montiel. 2017. Medio de cultivo y sustitutos de agar en el crecimiento *in vitro* de orquídeas. Revista Mexicana en Ciencias Agrícolas. 8(6):1315-1328.

- Frausto, J.K.A., M.C. Ojeda Z., O.G. Alvarado G., E.A. García Z., H. Rodríguez F. y G. Rodríguez P. 2019. Inducción de brotes a partir de varas florales de la orquídea *Phalaenopsis* spp. (Blume) *in vitro*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 10 (6):1207-1218.
- Gaudencio-Sedano, C., G. Alejandro-Manzo, H. Reymundo-Roldán y J.A. Castellanos. 2015. Propagación *in vitro* de orquídeas y otras ornamentales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 1:451-456.
- Gil, C.A.I., C.A. Ariza C., L.M. Castillo, L.E. Salgado D., L. Banda S. y L.E. Vanegas M. 2019. Inducción de organogénesis *in vitro* con 6-bencilaminopurina en *Cattleya trianae* Linden & Rchb.f. *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*. 22(2):2619-2551.
- Luan, V.Q., N.Q. Thien, D.V Khiem and D.T Nhut. 2006. *In vitro* germination capacity and plant recovery of some native and rare orchids. In: Thuy L T, Hau N V (eds) *Proceedings of International Workshop on Biotechnology in Agriculture*, Nong Lam University.
- Lugo-Lugo, H. 1955. Effects of nitrogen on the germination of *Vanilla planifolia* seeds. *American Journal of Botany*. 42 (7): 679-684.
- Miguel-Luna, M.E., J.R., Enríquez-del Valle, V.A. Velasco-Velasco, Y. Villegas-Aparicio, J.C. Carrillo-Rodríguez y G. Rodríguez-Ortiz. 2013. Composición del medio de cultivo y la incubación para enraizar brotes de agave. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. (6):1151-1159.
- Morard, P. and Henry, M. 1998. Optimization of the mineral composition of *in vitro* culture media. *Journal of plant nutrition*. 21(8): 1565-1576.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15:473-497.
- Ortiz, S.L. 2015. Ecología de la polinización de *Myrmecophila grandiflora* y *Brassavola nodosa* (Orchidaceae) en Tuxpan, Ver. Tesis de Maestría. Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Tuxpan, Veracruz, México. p. 66.
- Pedroza-Manrique, J., L. Serrato-Muñoz y M. Castaño-Robayo. 2010. Efecto del carbón activado y ácido indol acético en el desarrollo de protocormos de *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl. y *Maxillaria nutans* Lindl. *Revista Colombiana de Biotecnología* 12(2): 86-102.
- Seon, K.M., D.H. Kim, K.W. Kang, and I. Sivanesan. 2018. Highly competent *in vitro* propagation of *Thrixspermum japonicum* (Miq.) Rchb.f., a rare epiphytic orchid. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 54 (3): 302–308.
- Soonthornkalump S., K. Nakkanong and U. Meesawat. 2019. *In vitro* cloning via direct somatic embryogenesis and genetic stability assessment of *Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Stein: the endangered Venus's slipper orchid. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 55:265-276.
- Soto, A.M.A. y Salazar, A.G. 2004. Orquídeas. En: García-Mendoza, J.A; Ordoñez, D.J.M. y Briones-Salas, M. *Biodiversidad de Oaxaca*. UNAM. Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza. World Wildlife Fund. México. pp. 271-295.
- Wida, U.E.S., S. Hariyanto and Y.S. Wulan. 2017 *In vitro* propagation of the endangered medicinal orchid, *Dendrobium lasianthera* J.J. Sm through mature seed cultured. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 7(5):406-410.
- Yeung, E.C. 2017. A perspective on orchid seed and protocorm development, *Bot. Stud.* pp. 58-33.
- Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. *Am. Orchid Soc. Bull.* 15: 214–217.