



MORFOGÉNESIS *in vitro* DE *Stanhopea maculosa*, *Stanhopea martiana* Y *Stanhopea tigrina* POR ORGANOGÉNESIS DIRECTA

In vitro MORPHOGENESIS OF *Stanhopea maculosa*, *Stanhopea martiana* AND *Stanhopea tigrina* BY DIRECT ORGANOGENESIS

Omar Ricardo Gallegos-Venegas¹, Ma. Cristina G. López-Peralta^{2*},
Eleodoro Hernández-Meneses³ y Nicacio Cruz-Huerta¹

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad (PREGEP)-Fisiología Vegetal, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. ²Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, PREGEP-Genética, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México.

³Universidad Autónoma Chapingo, Unidad Regional Universitaria Sur Sureste, Teapa, Tabasco, México.

*Autor de correspondencia (cristy@colpos.mx)

RESUMEN

Stanhopea es un género de orquídeas con 55 especies, únicas del continente americano, y México es el segundo lugar en diversidad. Algunas especies están amenazadas, pues la dimensión, forma y aroma de sus flores mantienen el constante interés de colectarlas. Su estudio, conservación y multiplicación es posible mediante el uso de las técnicas del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. En esta investigación se evaluó la capacidad morfogénica *in vitro* de *Stanhopea maculosa*, *S. martiana* y *S. tigrina* por organogénesis directa. Semillas de cápsulas cerradas desinfectadas se germinaron *in vitro* en medio de Murashige y Skoog (MS) 50 %. En la inducción de brotes se colocaron plántulas sin raíz en medio MS 50 y 100 % con 6-benciladenina (BA, 11.36-22.72 µM), ácido 1-naftalenacético (ANA, 1.39 µM) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, 1.39 µM). En la multiplicación de brotes se depositaron brotes en MS 50 % con BA (10.04-28.40 µM), ANA (1.39 µM) y 2,4-D (1.39 µM). Para el alargamiento de brotes se pusieron brotes en MS 50 y 100 %, carbón activado (CA, 0.5 mg L⁻¹) y ácido giberélico (AG₃, 1.4-5.6 µM). Para enraizar *in vitro* se colocaron los brotes en MS 50 % con ácido indol-3-butírico (AIB, 2.46-10.0 µM), ácido indol-3-acético (AIA, 2.46-10.0 µM) y ANA (2.46-10.0 µM). En la inducción se obtuvieron 2.16 brotes en *S. maculosa* en MS (100 %) con 11.36 µM de BA y 1.36 µM de ANA, 2.50 brotes en *S. martiana* y 2.83 brotes en *S. tigrina* ambas en MS 50 % con 22.72 µM de BA y 1.36 µM de ANA. En la multiplicación *S. maculosa* produjo 2.6 brotes y *S. martiana* 5.0 brotes, ambas en medio MS 50 % con 22.72 µM de BA y 1.36 µM de 2,4-D y *S. tigrina* 5.0 brotes en medio MS 50 % con 11.36 µM de BA. En el alargamiento *S. maculosa* alcanzó 1.33 cm en MS 50 % con 4.2 µM de AG₃, mientras que *S. martiana* y *S. tigrina* obtuvieron una longitud de 2.82 cm y 2.42 cm, respectivamente, en medio MS 50 %. En el enraizamiento *in vitro* se obtuvieron 3.95 raíces por brote en *S. maculosa* en medio MS 50 % con 10.0 µM de AIB, en *S. martiana* 5.25 raíces con 2.46 µM de AIB y en *S. tigrina* 8.75 raíces con 4.96 µM de AIB. Esta investigación brinda las bases para la propagación *in vitro* del género *Stanhopea*.

Palabras clave: *Stanhopea maculosa*, *S. martiana*, *S. tigrina*, cultivo *in vitro*, organogénesis.

SUMMARY

Stanhopea is a genus of orchids with 55 species exclusive to the Americas, with Mexico ranking as the second most diverse country. Some species are threatened as their floral dimension, shape and aroma maintain constant interest in collecting them. The study on their conservation and propagation

can be achieved using *in vitro* culture techniques. This research evaluated the *in vitro* morphogenic capacity of *Stanhopea maculosa*, *S. martiana* and *S. tigrina* by direct organogenesis. Seeds from closed, disinfected capsules were germinated in Murashige and Skoog (MS) medium 50 %. At shoot induction, rootless seedlings were cultured in MS 50 and 100 % with 6-benzyladenine (BA, 11.36-22.72 µM), 1-naphthaleneacetic acid (NAA, 1.39 µM) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D, 1.39 µM). Shoot multiplication was achieved in MS 50 % with BA (10.04-28.40 µM), NAA (1.39 µM) and 2,4-D (1.39 µM). For shoot elongation, shoots were placed in MS 50 and 100 %, activated charcoal (AC, 0.5 mg L⁻¹) and gibberellic acid (GA, 1.4-5.6 µM). For *in vitro* rooting, shoots were placed in MS 50 % with indole-3-butyric acid (IBA, 2.46-10.0 µM), indole-3-acetic acid (IAA, 2.46-10.0 µM) and NAA (2.46-10.0 µM). At the induction, 2.16 shoots were obtained in *S. maculosa* cultured in MS 100 % with 11.36 µM BA and 1.36 µM NAA, 2.50 shoots in *S. martiana*, and 2.83 shoots in *S. tigrina* with MS 50 % with 22.72 µM BA and 1.36 µM NAA. In shoot multiplication, *S. maculosa* produced 2.6 shoots and *S. martiana* 5.0 shoots, both in MS 50 % with 22.72 µM BA and 1.36 µM 2,4-D, and *S. tigrina* 5.0 shoots in MS 50 % with 11.36 µM BA. In shoot elongation *S. maculosa* reached 1.33 cm in MS 50 % with 4.2 µM GA, while *S. martiana* and *S. tigrina* obtained a length of 2.82 and 2.42 cm, respectively, in MS 50 % medium. *In vitro* rooting produced 3.95 roots in *S. maculosa* with 10.0 µM IBA, 5.25 roots in *S. martiana* with 2.46 µM IBA, and 8.75 roots in *S. tigrina* with 4.96 µM IBA. These research provides the basis for *in vitro* propagation of the genus *Stanhopea*.

Key words: *Stanhopea maculosa*, *S. martiana*, *S. tigrina*, *in vitro* culture, organogenesis.

INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae está constituida aproximadamente por 30 mil especies, es el segundo grupo de plantas más grande después de Asteraceae, las cuales han evolucionado desde hace aproximadamente 12 millones de años (Alghamdi, 2019; Tamayo, 2018). Las orquídeas son sumamente apreciadas a nivel mundial por su alto valor ornamental; no obstante, a pesar de su abundante diversidad, las poblaciones silvestres enfrentan severos problemas de preservación, como consecuencia de el saqueo, el cambio climático, la comercialización

ilegal y la pérdida del hábitat por actividades humanas que, entre otros factores, merman a largo plazo sus tasas reproductivas y de supervivencia (Sedano *et al.*, 2015).

México alberga cerca de 1200 especies de orquidáceas (Hágsater *et al.*, 2006), de las cuales el 15 % está considerado en alguna categoría de riesgo (SEMARNAT, 2010), puesto que un gran número de estas especies aún carece de un plan de manejo integrado por tecnologías óptimas para su reproducción, conservación o para su uso comercial. Dentro de los géneros aprovechados por el atractivo de sus flores se halla *Stanhopea*, actualmente cuenta con 14 especies identificadas (Téllez, 2011). *Stanhopea tigrina* está ubicada en categoría de riesgo en la NOM 059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010) y junto con *S. maculosa* y *S. martiana* forma parte de las seis especies endémicas identificadas (Hernández *et al.*, 2022); no obstante, son pocos los estudios referentes a su manejo.

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales (CTV) *in vitro* ofrecen la oportunidad de obtener material vegetal vigoroso con el uso del medio de cultivo apropiado y los reguladores de crecimiento vegetal adecuados (Su *et al.*, 2021), por lo que la presente investigación tuvo como objetivo determinar la efectividad de diferentes concentraciones hormonales en la capacidad morfogénica *in vitro* de *Stanhopea maculosa*, *S. martiana* y *S. tigrina* por organogénesis directa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y desinfección

Se emplearon cápsulas cerradas de cinco a siete meses de edad obtenidas por polinización manual de las orquídeas *S. maculosa*, *S. martiana* y *S. tigrina* cultivadas en el Estado de México. Las cápsulas se lavaron con detergente comercial durante 5 min y se enjuagaron con agua de la llave. Después se introdujeron en una mezcla de hipoclorito de sodio comercial Cloralex® (NaOCl 30 % v/v), Microdyn® (1 % v/v) y Tween 20® (4 % v/v) en agitación constante por 15 min seguido de cinco enjuagues con agua destilada esterilizada. Finalmente, se sumergieron en Captán® (N-triclorometilto4-ciclohexeno-1,2 dicarboximida, 4 g L⁻¹) en agitación constante durante 15 min y se colocaron sin enjuagar en una placa Petri donde se les hizo un corte y se sembraron las semillas en frascos de cultivo.

Medio y condiciones de cultivo

En todas las etapas del proceso de organogénesis directa se empleó el medio básico de Murashige y Skoog (MS, 1962) suplementado con sacarosa (30 g L⁻¹), myo-inositol (1.0 mg L⁻¹), tiamina (0.4 mg L⁻¹) y agar Sigma-Aldrich® (7

g L⁻¹). El pH del medio se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl 1N y se esterilizó en autoclave vertical (AESA® 300, México) a 121 °C y 1.5 kg cm⁻² de presión durante 20 min. El material vegetal *in vitro* se mantuvo en un cuarto de incubación a 25 ± 2 °C, 16 h de luz y 8 h de oscuridad con intensidad luminosa de 45 µmol m⁻² s⁻¹ y humedad relativa de 40 %.

Germinación *in vitro*

Las semillas se depositaron en medio de cultivo básico MS a la mitad de concentración de sales inorgánicas en frascos de vidrio de 100 mL de capacidad con 40 mL de medio. Se observaron los cambios morfológicos de las semillas y se contabilizó el porcentaje de los frascos donde se estableció el cultivo axénico y ocurrió la germinación.

Inducción de brotes

Se usaron como explantes plántulas *in vitro* de 15 a 20 semanas de edad, longitud promedio de 2 cm, con tres o cuatro hojas formadas y sin raíz. Se estableció un explante en cada frasco de vidrio de 45 mL de capacidad con 10 mL de medio. Se evaluaron 20 tratamientos constituidos por medio de cultivo MS al 50 y 100 % adicionados con los reguladores de crecimiento BA, ANA y 2,4-D (Cuadro 1). Se hizo un subcultivo a los mismos tratamientos a las cuatro semanas. Después de 7-9 semanas se cuantificó el número de explantes que generaron brotes (B, %), el número de brotes por explante (BE) y la longitud de brotes (LB, cm). Se usó un diseño completamente al azar con 12 repeticiones y la unidad experimental fue un frasco con un explante.

Multiplicación de brotes

Se utilizaron como explantes grupos de dos a tres brotes de 3 cm de longitud resultantes de la etapa de inducción, se sembraron en frascos de vidrio de 100 mL de capacidad con 30 mL de medio de cultivo MS 50 % adicionado con reguladores de crecimiento de cinco tratamientos del Cuadro 1 (1, 6, 7, 9 y 10) y dos nuevos tratamientos en los que se adicionó BA (28.40 µM) + ANA (1.36 µM) y BA (28.40 µM) + 2,4-D (1.36 µM). Al término de cuatro semanas se cuantificó BE. Se usó un diseño completamente al azar con 10 repeticiones y la unidad experimental fue un explante por cada frasco.

Alargamiento de brotes

Se emplearon como explantes grupos de dos a tres brotes de 2 cm de longitud producidos en la etapa de multiplicación. Se colocaron en frascos de vidrio de 100 mL de capacidad con 30 mL de medio de cultivo MS, carbón activado y ácido giberélico (Cuadro 2). Después de cuatro semanas se midió la longitud de los brotes (LB, cm). El

Cuadro 1. Tratamientos evaluados en la inducción de brotes en *S. maculosa*, *S. martiana* y *S. tigrina*.

Tratamiento (Núm.)	MS (%)	BA (μM)	ANA (μM)	2,4-D	Tratamiento (Núm.)	MS (%)	BA (μM)	ANA (μM)	2,4-D
1 (Testigo)	50	-	-	-	11	100	-	-	-
2	50	11.36	-	-	12	100	11.36	-	-
3	50	11.36	1.36	-	13	100	11.36	1.36	-
4	50	11.36	-	1.36	14	100	11.36	-	1.36
5	50	17.04	-	-	15	100	17.04	-	-
6	50	17.04	1.36	-	16	100	17.04	1.36	-
7	50	17.04	-	1.36	17	100	17.04	-	1.36
8	50	22.72	-	-	18	100	22.72	-	-
9	50	22.72	1.36	-	19	100	22.72	1.36	-
10	50	22.72	-	1.36	20	100	22.72	-	1.36

MS: medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962), BA: 6-benciladenina, ANA: ácido 1-naftalenacético, 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

diseño experimental fue completamente al azar con 10 repeticiones y la unidad experimental fue un frasco con un explante.

Enraizamiento *in vitro* de brotes

Se utilizaron brotes de 3.5 cm sin raíz como explantes generados en la etapa de alargamiento. Se colocaron en frascos de vidrio de 250 mL con 40 mL de medio MS 50 % adicionado con ácido indol-3-butírico (AIB, 2.46, 4.96, 7.44 y 10.0 μM), ácido indol-3-acético (AIA, 2.46, 4.96, 7.44 y

10.0 μM) y ácido 1-naftalenacético (ANA, 2.46, 4.96, 7.44 y 10.0 μM) y un testigo sin reguladores de crecimiento. En las especies *S. martiana* y *S. tigrina* se hizo un segundo subcultivo a los mismos tratamientos a las cinco semanas. A partir del establecimiento, al término de cinco semanas en *S. maculosa* y 11 semanas en *S. martiana* y *S. tigrina* se cuantificaron la cantidad de raíces producidas por brote (RB) y la longitud de raíces (LR, cm). Se usó un diseño completamente al azar con 10 repeticiones y la unidad experimental fue un frasco con dos brotes.

Cuadro 2. Tratamientos con carbón activado (CA) y ácido giberélico (AG_3) evaluados en el alargamiento de brotes de *S. maculosa*, *S. martiana* y *S. tigrina*.

Tratamiento (Núm.)	MS (%)	CA (g L ⁻¹)	AG_3 (μM)	Tratamiento (Núm.)	MS (%)	CA (g L ⁻¹)	AG_3 (μM)
1 (Testigo)	50	-	-	7	100	-	-
2	50	0.5	-	8	100	0.5	-
3	50	-	1.4	9	100	-	1.4
4	50	-	2.8	10	100	-	2.8
5	50	-	4.2	11	100	-	4.2
6	50	-	5.6	12	100	-	5.6

MS: medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962).

Análisis estadístico

A partir de la etapa de inducción de brotes hasta enraizamiento *in vitro* se hizo análisis de varianza en las variables evaluadas de cada especie con el sistema de análisis estadístico SAS versión 9.1 (SAS Institute, 2003), se usó la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) para la comparación de medias entre tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación *in vitro*

La germinación ocurrió en el 100 % de los frascos cultivados con semillas en las tres especies. *Stanhopea maculosa* germinó en promedio a los 51 días después de la siembra (dds), iniciando a los 35 dds (Figura 2A) y terminando a los 67 dds (Figura 2B); en *S. martiana* el tiempo promedio de germinación fue de 32 dds, iniciando a los 17 dds (Figura 3A) y terminando a los 48 dds (Figura 3B), mientras que en *S. tigrina* ocurrió en promedio a los 42 dds, con inicio a los 17 dds (Figura 4A) y terminó a los 60 dds (Figura 4B). En las tres especies ocurrió el aumento de tamaño de las semillas con un incremento en su verdor y terminó con la emisión del brote apical y la formación de rizomas en los protocormos, mostrando los cambios morfológicos típicos en la germinación y crecimiento de plántulas de orquídeas (Seaton y Ramsay, 2005). El

intervalo en que ocurrió la germinación de estas especies es semejante al reportado por Castillo-Pérez *et al.* (2021) en *S. tigrina*, donde se observó el rompimiento de la testa a partir de los 30 dds, seguido de la formación de protocormos y culminando con la emisión de primordios foliares a los 65 dds, en tanto que en *S. hennedzii* se observaron respuestas desde la imbibición hasta el rompimiento de la testa en un periodo de 21 dds (Arellano-García *et al.*, 2020); no obstante, en la actualidad son escasos los trabajos de cultivo *in vitro* para determinar contrastes con otras especies cercanas de la subtribu Stanhopeinae.

Inducción de brotes

Se observó la emisión de brotes normales a partir de la base de los explantes en cada especie (Figuras 2C, 3C, 4C); sin embargo, los reguladores de crecimiento y el medio de cultivo no produjeron un efecto significativo en B (%) para ninguna de las tres especies, lo que sugiere que la sola exposición de los explantes al MS determina la aparición de brotes adventicios. En las variables BE y LB no todos los tratamientos produjeron el mismo efecto en cada especie (Cuadro 3); sin embargo, no se presentaron semejanzas en los tratamientos que produjeron los valores más altos, lo que refleja que el genotipo de cada orquídea determinó el potencial de respuesta morfogénica en las técnicas del cultivo *in vitro*, por lo que la presencia del BA y las auxinas en las concentraciones propuestas funcionaron

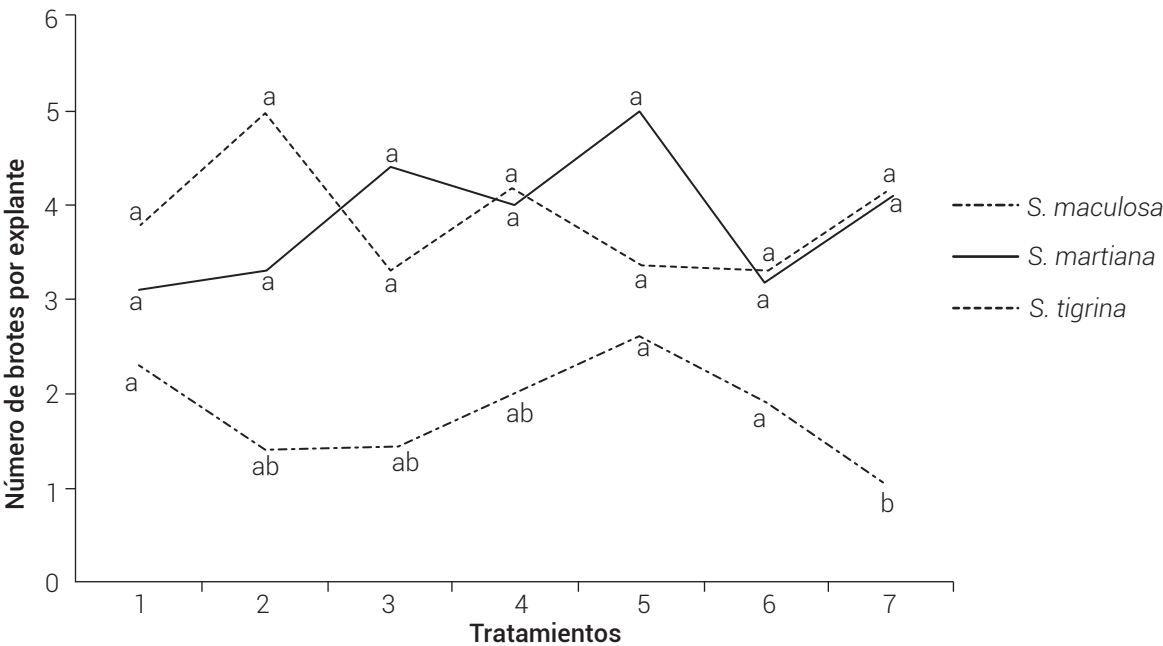


Figura 1. Comparación de medias en número de brotes por explante (BE) por el efecto de siete tratamientos en la multiplicación de brotes de tres especies del género *Stanhopea*. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). Error estándar. *S. maculosa* = 0.80, *S. martiana* = 2.62, *S. tigrina* = 2.45.

efectivamente como parte del proceso organogénico, permitiendo un desarrollo normal de tallos y hojas en cada brote.

Por otro lado, Cruz-Cruz *et al.* (2022) registraron en *S. tigrina* 4.5 brotes en MS completo después de 24 semanas, mientras que Castillo-Pérez *et al.* (2021) reportaron un promedio de 1.25 brotes en medio MS 100 % con 22.72 μM de BA en *S. tigrina* después de cuatro semanas de cultivo. Las diferencias encontradas en las respuestas al cultivo *in vitro* entre algunas especies de orquídeas ha conducido a establecer protocolos individualizados para su propagación.

Multiplicación de brotes

Los explantes emitieron brotes normales en las tres especies (Figuras 2D, 3D, 4D), BE se vio afectada significativamente sólo en *S. maculosa* produciendo un máximo de 2.6 brotes en MS 50 % con 22.72 μM de BA y 1.36 μM de 2,4-D (Figura 1). La BA es una de las citocininas más utilizadas para inducir división celular y estimular la proliferación de brotes en combinación con auxinas u otras

citocininas durante el proceso de morfogénesis (Castillo-Pérez *et al.* 2021), con ella se observó un incremento en el número de brotes respecto de los obtenidos en la etapa de inducción, el efecto fue más evidente en *S. martiana* y *S. tigrina* en cualquiera de los tratamientos.

Alargamiento de brotes

La concentración de sales inorgánicas del medio MS, y el uso de CA y de AG_3 (Cuadro 2) afectó significativamente la longitud de brotes en *S. martiana* y *S. tigrina* después de cuatro semanas (Cuadro 4), en ambas especies el subcultivo efectuado en medio MS 50 % fue el más propicio para incrementar su crecimiento; no obstante, en el estudio de Chávez y Castro (2021) *S. tigrina* emitió brotes que alcanzaron hasta 22.22 cm de longitud en un medio MS 100 % a las 16 semanas; mientras que Cruz-Cruz *et al.* (2022) obtuvieron en *S. tigrina* 7.20 cm en MS 100 % después de 16 semanas. Por otro lado, en *S. hennedzii* se obtuvieron 5.73 cm de longitud en plántulas *in vitro* subcultivadas en medio MS 100 % con 22.72 μM de BA después de 16 semanas (Arellano-García *et al.*, 2020).

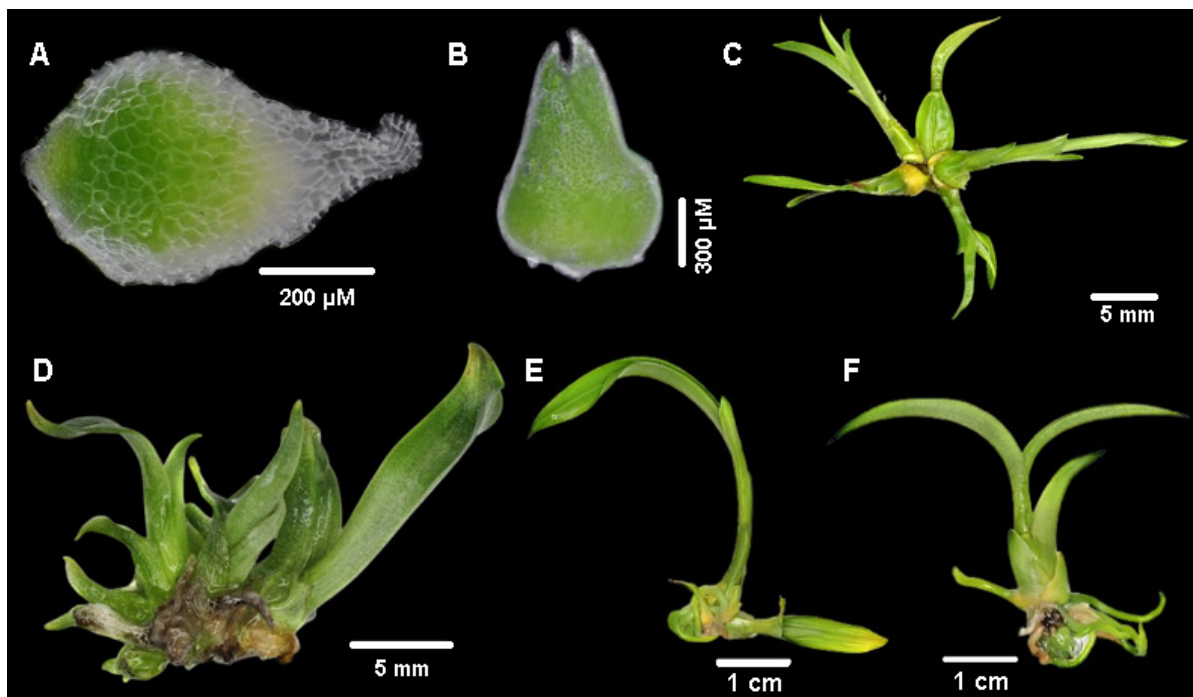


Figura 2. Etapas del proceso morfogénico *in vitro* para *Stanhopea maculosa* por organogénesis directa. A) Inicio de la germinación *in vitro* a los 35 días después de siembra (dds), B) término de la germinación *in vitro* después de 67 días, C) inducción de brotes en MS 100 % con 11.36 μM de BA y 1.36 μM de 2,4-D después de siete semanas, D) multiplicación de brotes en MS 50 % con 22.72 μM de BA y 1.36 μM de ANA después de cuatro semanas, E) alargamiento de brotes en MS 50 % con 4.2 μM de AG_3 después de cuatro semanas, F) enraizamiento *in vitro* en MS 50 % con 10.0 μM de AIB después de cinco semanas.

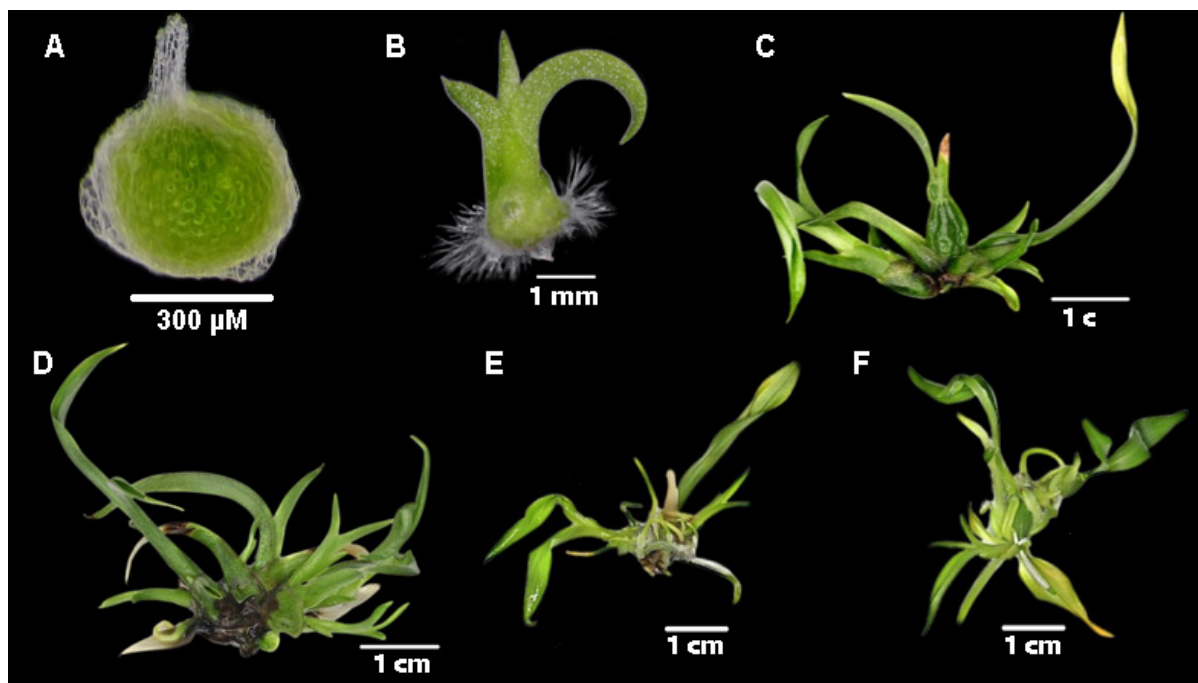


Figura 3. Etapas del proceso morfogénico *in vitro* para *Stanhopea martiana* por organogénesis directa. A) Inicio de la germinación *in vitro* a los 32 días después de siembra (dds), B) término de la germinación *in vitro* a los 48 dds, C) inducción de brotes en MS 50 % con 22.72 µM de BA y 1.36 µM de 2,4-D después de nueve semanas, D) multiplicación de brotes en MS 50 % con 22.72 µM de BA y 1.36 µM de 2,4-D después de cuatro semanas, E) alargamiento de brotes en MS 50 % después de cuatro semanas, F) enraizamiento *in vitro* en MS 50 % con 2.46 µM de AIB después de 11 semanas.

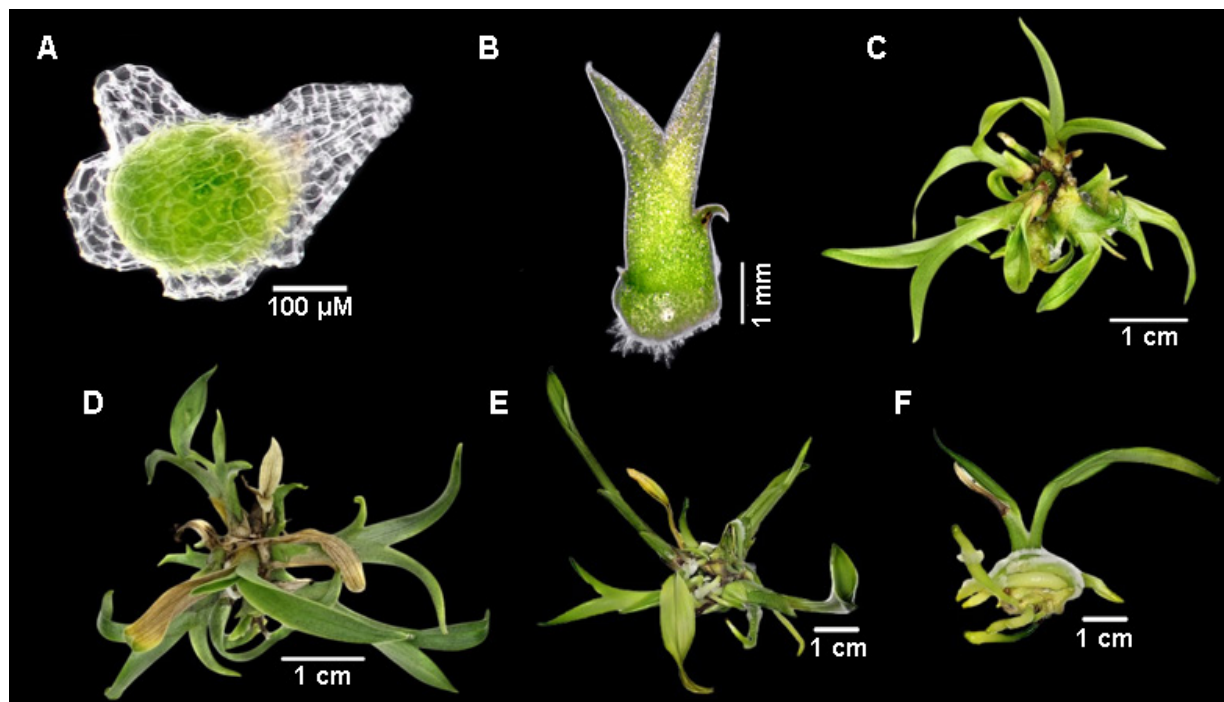


Figura 4. Etapas del proceso morfogénico *in vitro* para *Stanhopea tigrina* por organogénesis directa. A) Inicio de la germinación *in vitro* a los 42 días después de siembra (dds), B) término de la germinación *in vitro* a los 60 dds, C) inducción de brotes en MS 50 % con 22.72 µM de BA y 1.36 µM de ANA después de nueve semanas, D) multiplicación de brotes en MS 50 % con 11.36 µM de BA después de cuatro semanas, E) alargamiento de brotes en MS 50 % después de cuatro semanas, F) enraizamiento *in vitro* en MS 50 % con 10.0 µM de AIA después de 11 semanas.

Cuadro 3. Efecto de la concentración del medio MS (1962), citocininas y auxinas en el número de brotes por explante (BE) y longitud de brotes (LB) en la etapa de inducción de brotes en tres especies del género *Stanhopea*.

Tratamiento (Núm.)	<i>S. maculosa</i>		<i>S. martiana</i>		<i>S. tigrina</i>	
	BE	LB (cm)	BE	LB (cm)	BE	LB (cm)
1	1.58 abcde	0.27 abc	1.16 b	0.89 cd	1.16 b	1.35 abc
2	1.75 abcd	0.35 abc	2.25 ab	1.14 abcd	2.41 ab	1.56 abc
3	1.08 bcde	0.19 bc	1.75 ab	1.59 abc	1.91 ab	1.86 a
4	1.83 abc	0.23 abc	2.08 ab	1.70 ab	2.50 ab	1.50 abc
5	2.08 ab	0.65 abc	2.08 ab	1.70 ab	2.58 a	1.84 ab
6	2.08 ab	0.56 abc	2.16 ab	1.47 abcd	2.33 ab	1.42 abc
7	1.00 cde	0.14 c	2.41 a	1.39 abcd	2.83 a	1.45 abc
8	1.83 abc	0.26 abc	2.08 ab	1.48 abcd	2.33 ab	1.42 abc
9	1.66 abcde	0.68 abc	2.16 ab	1.83 a	2.66 a	1.90 a
10	1.25 abcde	0.30 abc	2.50 a	0.74 d	2.75 a	0.89 c
11	1.50 abcde	0.62 abc	1.41 ab	1.65 abc	1.66 ab	1.81 abc
12	2.00 abc	0.59 abc	2.25 ab	1.47 abcd	2.33 ab	1.52 abc
13	2.16 a	0.80 ab	1.83 ab	1.48 abcd	2.25 ab	1.55 abc
14	0.75 de	0.31 abc	2.25 ab	1.05 abcd	2.25 ab	1.25 abc
15	1.08 bcde	0.56 abc	2.08 ab	1.55 abc	2.25 ab	1.61 abc
16	1.66 abcde	0.62 abc	1.41 ab	1.47 abcd	1.83 ab	1.62 abc
17	1.08 bcde	0.20 bc	2.00 ab	0.97 bcd	2.41 ab	1.13 abc
18	1.41 abcde	0.70 abc	2.00 ab	1.24 abcd	2.58 a	1.26 abc
19	1.41 abcde	0.81 a	2.25 ab	1.64 abc	2.66 a	1.69 abc
20	0.66 e	0.12 c	2.16 ab	0.75 d	2.50 ab	0.91 bc
Error estándar	0.49	0.17	0.68	0.29	0.90	0.40

Medias con letras iguales en cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).**Cuadro 4. Efecto de la concentración del medio MS (1962), carbón activado y ácido giberélico en la longitud de brotes (LB) en tres especies del género *Stanhopea*.**

Tratamiento (Núm.)	<i>S. maculosa</i>	<i>S. martiana</i>	<i>S. tigrina</i>
	LB (cm)	LB (cm)	LB (cm)
1	0.90 a	2.82 a	2.42 a
2	0.71 a	2.50 ab	2.13 ab
3	0.54 a	2.57 a	2.06 ab
4	0.77 a	1.98 b	1.08 b
5	1.03 a	2.28 ab	0.91 b
6	0.93 a	1.99 b	1.37 ab
7	0.70 a	1.87 b	1.58 ab
8	1.01 a	2.57 a	1.61 ab
9	0.83 a	2.32 ab	1.67 ab
10	0.54 a	1.69 c	1.40 ab
11	0.97 a	2.22 ab	1.37 ab
12	1.02 a	1.68 c	2.00 ab
Error estándar	0.81	0.77	0.85

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

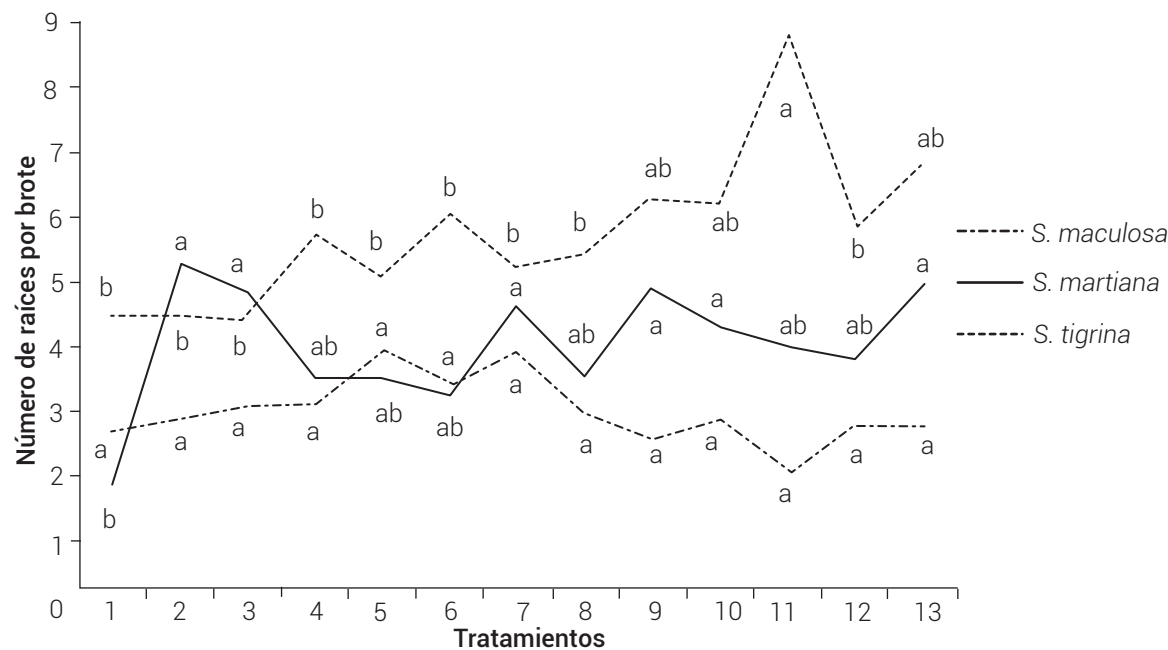


Figura 5. Comparación de medias del número de raíces por brote (RB) producidas por el efecto de AIA, AIB y ANA en el enraizamiento *in vitro* de tres especies del género *Stanhopea*. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). Error estándar: *S. maculosa* = 2.68, *S. martiana* = 2.42, *S. tigrina* = 2.83.

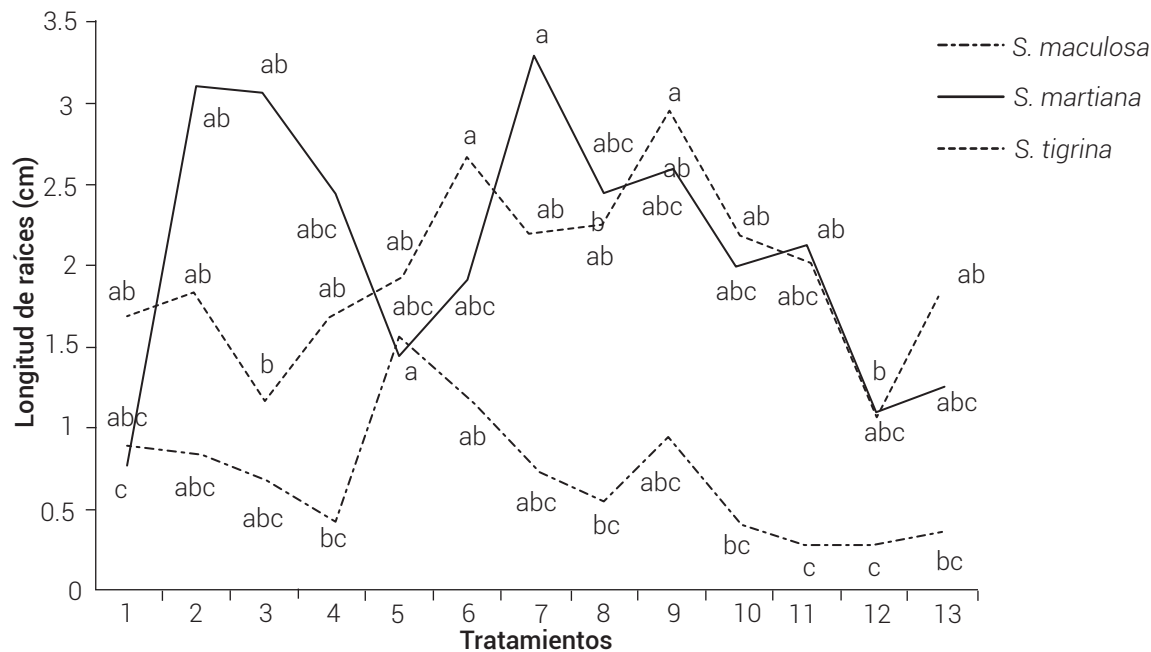


Figura 6. Comparación de medias de la longitud de raíces (LR) producidas por el efecto de AIA, AIB y ANA en el enraizamiento *in vitro* de tres especies del género *Stanhopea*. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). Error estándar: *S. maculosa* = 0.34, *S. martiana* = 1.66, *S. tigrina* = 0.80.

Enraizamiento *in vitro* de brotes

Finalmente, en el enraizamiento *in vitro* en medio MS 50 % los brotes produjeron raíces adventicias normales en cada una de las especies (Figuras 2F, 3F, 4F), el uso de las diferentes auxinas afectó significativamente el comportamiento de las tres especies. Los valores de RB en *S. maculosa* alcanzaron hasta 3.95 raíces con 10.0 μM de AIB a las cinco semanas, en *S. martiana* se obtuvieron hasta 5.25 raíces con 2.46 μM de AIB, y en *S. tigrina* un máximo de 8.75 raíces con 4.96 μM de AIB, ambas después de 11 semanas (Figura 5), mientras que en la variable LR *S. maculosa* obtuvo una longitud máxima de 1.57 cm y *S. tigrina* de 2.96 cm, ambas con 10 μM de AIB, mientras que *S. martiana* logró desarrollar raíces de hasta 3.31 cm de longitud con 4.96 μM de AIA (Figura 6).

Por otra parte, la formación de raíces *in vitro* se estudió en *S. tigrina* donde Chávez y Castro (2021) obtuvieron 5.63 raíces de 0.79 cm en MS 100 % con 10 % de pulpa de plátano después de 16 semanas, en tanto que Castillo-Pérez *et al.* (2021) suministraron 28.27 μM de AIA y 10 % de agua de coco en MS 100 % obteniendo hasta nueve raíces después de 12 semanas. En comparación, las especies evaluadas en la presente investigación presentaron un menor tiempo de exposición a los tratamientos, superando algunos de los valores reportados, por lo que se recomienda el uso de auxinas en un medio MS 50 %.

CONCLUSIONES

Se estableció el primer protocolo de morfogénesis *in vitro* por organogénesis directa para *Stanhopea maculosa*, *S. martiana* y *S. tigrina* a partir de plántulas germinadas *in vitro* utilizadas como explantes. Se logró la inducción, multiplicación, alargamiento y enraizamiento de brotes *in vitro*. Este protocolo constituye una alternativa para la multiplicación clonal de las tres especies y se amplían las bases para el estudio, preservación y multiplicación del género *Stanhopea* tanto en las zonas tropicales de México como en otras regiones donde son aprovechadas y es necesaria su conservación.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo por la utilización de la infraestructura. Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (Actualmente SECIHTI) por la beca otorgada al primer autor para desarrollar estudios de posgrado.

BIBLIOGRAFÍA

- Alghamdi S. A. (2019) Influence of mycorrhizal fungi on seed germination and growth in terrestrial and epiphytic orchids. *Saudi Journal of Biological Sciences* 26:495-502, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.10.021>
- Arellano-García J., O. Enciso-Díaz, A. Flores-Palacios, S. Valencia-Díaz, A. Flores-Morales and I. Perea-Arango (2020) Asymbiotic germination, effect of plant growth regulators, and chitosan on the mass propagation of *Stanhopea hernandezii* (Orchidaceae). *Botanical Sciences* 98:524-533, <https://doi.org/10.17129/botsci.2559>
- Castillo-Pérez L. J., D. Martínez-Soto, J. Fortanelli-Martínez and C. Carranza-Álvarez (2021) Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and symbiotic acclimatization of the Mexican threatened orchid *Stanhopea tigrina*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 146:249-257, <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02064-9>
- Chávez L. C. y O. R. Castro M. (2021) Sustancias orgánicas y luz en el desarrollo *in vitro* de *Stanhopea tigrina* Bateman ex Lindl. In: Sociedad, Permacultura y Agricultura Sustentable. Hacia una Educación y Cultura Ambiental. E. Velázquez C. y M. J. Sánchez C. (coords.) Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México, México. pp:266-278.
- Cruz-Cruz C. A., M. T. González-Armao, J. R. Bautista-Aguilar and M. A. Ramírez-Mosqueda (2022) *In vitro* short-term storage of *Stanhopea tigrina* Bateman ex Lind. *South African Journal of Botany* 151:334-338, <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.10.014>
- Hágsater E., M. A. Soto A., G. A. Salazar C., R. Jiménez M., M. A. López R. y R. L. Dressler (2005) Las Orquídeas de México. Instituto Chinoín México, D.F. México. 304 p.
- Hernández C. M., J. L. Alanís-Méndez, J. L. Chagoya-Fuentes and O. J. Enciso Díaz (2022) Potential distribution of six endemic species of *Stanhopea* (Orchidaceae) genus in Mexico. *Current Botany* 13:81-88, <https://doi.org/10.25081/cb.2022.v13.7772>
- Murashige T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid plant growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497, <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- SAS Institute (2003) The SAS System for windows. Release 9.1. SAS Institute, North Carolina, USA.
- Seaton P. and M. Ramsay (2005) Growing Orchids from Seed. Royal Botanic Gardens Kew. Richmond, UK. 83 p.
- Sedano C. G., A. Manzo G., R. Roldán H. y J. A. Castellanos S. (2015) Propagación *in vitro* de orquídeas y otras ornamentales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6:451-456.
- SEMARNAT, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2010) Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. México D. F. 30 de diciembre de 2010.
- Su Y. H., L. P. Tang, X. Y. Zhao and X. S. Zhang (2021) Plant cell totipotency: insights into cellular reprogramming. *Journal of Integrative Plant Biology* 63:228-243, <https://doi.org/10.1111/jipb.12972>
- Tamayo C. I. (2018) El uso de fósiles para entender el origen y aspectos evolutivos de las orquídeas. *Desde el Herbario CICY* 10:257-262.
- Téllez V. M. Á. A. (2011) Diagnóstico de la Familia Orchidaceae en México. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México, México. 181 p.