



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y
DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.



**CONSERVACIÓN *IN VITRO* EN CONDICIONES
DE CRECIMIENTO MÍNIMO DE *Bletia
purpurea* (LAM.) Y EVALUACIÓN DE LA
ESTABILIDAD GENÉTICA**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA FLORICULTURA

PRESENTA

DORIS MARISSA CANUL PECH

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO. JUNIO 2011



LIBERACIÓN DEL SÍNODO



Mérida, Yucatán a 28 de junio de 2011

Dr. Rodrigo Barba González
Coordinador Académico de la Maestría
en Ciencias de la Floricultura
Guadalajara, Jalisco

Los que suscriben integrantes del jurado de examen de grado de la estudiante Doris Marissa Canul Pech, una vez leída y revisada la Tesis titulada “CONSERVACIÓN *IN VITRO* EN CONDICIONES DE CRECIMIENTO MÍNIMO DE *Bletia purpurea* (LAM.) Y EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por la alumna para aspirar al grado de Maestro en Ciencias de la Floricultura durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente a los veintiocho días del mes de junio del año 2011.

Dra. Nancy Santana buzzy
Presidente

Dra. Ingrid Mayanín Rodríguez Buenfil
Secretario

Dra. Sara Luz Nahuat Dzib
Vocal

Dra. Ana Luisa Ramos Díaz
Vocal

Dra. Guadalupe López Puc
Vocal

DEDICATORIAS

A mi hijo

Ely

*Por esos momentos importantes de tu vida a los que tuve
que renunciar, todo esto fue por ti, mi mayor motivo de
superación.*

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el financiamiento otorgado por el Fondo Mixto Gobierno del Estado de Campeche-CONACYT al proyecto “Establecimiento de un banco de germoplasma *in vitro* de orquídeas nativas del Estado Campeche. Fomix-Campeche 96713, del cual forma parte este estudio.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Unidad Sureste por facilitar el uso de sus instalaciones y equipos para la realización de esta tesis.

Agradezco a la directora de tesis, la Dra. Guadalupe López por la oportunidad brindada, por el interés y disposición para la realización de este trabajo.

A la Dra. Ingrid Rodríguez por su valiosa colaboración y aportes en el diseño experimental y análisis de datos.

Gracias a la Dra. Ana Luisa Ramos por la enseñanza y asesoría brindada en el análisis molecular de este estudio, por la paciencia, dedicación y disponibilidad otorgada en todo momento.

De manera especial agradezco a los investigadores, Dra. Nancy Santana, Dra. Sara Luz Nahuat y Dra. Julia Cano, por todos los aportes realizados en las revisiones.

A mis compañeras, Julia, Lyn, Adris y Paola, por la invaluable amistad que me brindan.

INDICE DE CONTENIDO

	Página
Índice de cuadros.	i
Índice de figuras.	v
Abreviaturas.	ix
Resumen.	xi
Abstract.	xiii
I INTRODUCCIÓN.	1
II ANTECEDENTES.	7
2.1 FAMILIA ORCHIDACEAE.	9
2.1.1 Orquídeas de México.	10
2.1.2. Orquídeas nativas de la península de Yucatán.	12
2.1.3 Genero <i>Bletia</i> Ruiz y Pavón.	13
2.1.4 <i>Bletia purpurea</i> (Lam.) DC.	14
2.2 CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA VEGETAL.	16
2.2.1 Importancia de la conservación <i>in vitro</i> de germoplasma vegetal	17
2.2.2 Métodos de conservación <i>in vitro</i> .	17
2.2.3 Métodos de crecimiento mínimo.	18
2.2.4 Aplicaciones del método de crecimiento mínimo.	20
2.3 ESTABILIDAD GENÉTICA DEL GERMOPLASMA.	23
2.3.1 Marcadores moleculares basados en ADN.	24
2.3.1.1 Marcadores moleculares basados en PCR: amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD).	25
2.3.2 Evaluación de la estabilidad genética de germoplasma conservado <i>in vitro</i> mediante RAPDs.	27
III HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	29
3.1 HIPÓTESIS.	31
3.2 OBJETIVO GENERAL.	31
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	31

IV	MATERIALES Y MÉTODOS.	33
4.1	MATERIAL VEGETAL.	36
4.2	COMPOSICIÓN BÁSICA DE LOS MEDIOS DE CONSERVACIÓN EN CRECIMIENTO MÍNIMO Y CONDICIONES DE CULTIVO.	36
4.3	CULTIVO EN CONDICIONES DE CRECIMIENTO MÍNIMO.	37
4.4	REGENERACIÓN <i>IN VITRO</i> .	39
4.5	EXTRACCIÓN DE ADN.	39
4.6	EVALUACIÓN DEL ADN EXTRAÍDO.	42
4.7	SELECCIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS.	42
4.8	ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE RAPD.	43
V	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	45
5.1	EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>B. purpurea</i> EN DIFERENTES TRATAMIENTOS PLANTEADOS PARA LOGRAR EL CRECIMIENTO MÍNIMO.	47
5.1.1	EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS PLANTEADOS PARA EL CRECIMIENTO MÍNIMO <i>IN VITRO</i> EN LA ALTURA, NÚMERO DE HOJAS Y NÚMERO DE RAÍCES DE <i>B. purpurea</i> .	48
5.1.2.	EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS PLANTEADOS PARA EL CRECIMIENTO MÍNIMO <i>IN VITRO</i> EN LA FORMACIÓN DE BROTES DE <i>B. purpurea</i> .	52
5.2	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REGENERACIÓN <i>IN VITRO</i> DE <i>B. purpurea</i> DESPUÉS DE 6 MESES DE CONSERVACIÓN EN MEDIO DE CRECIMIENTO MÍNIMO.	59

5.3	ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA DE <i>B. purpurea</i> DESPUÉS DE LA CONSERVACIÓN EN CRECIMIENTO MÍNIMO <i>IN VITRO</i> .	60
VI	CONCLUSIONES.	65
VII	RECOMENDACIONES.	69
VIII	BIBLIOGRAFIA.	73

ÍNDICE DE CUADROS

No. Cuadro		Página
1	Composición básica del medio de cultivo MS utilizado en los estudios de conservación.	37
2	Tratamientos de los medios evaluados con variable codificada y real para la conservación <i>in vitro</i> de <i>B. purpurea</i> .	38
3	Secuencias de los oligonucleótidos para la amplificación aleatoria del ADN polimórfico.	42
4	Mezcla de reacción utilizada para el análisis genómico con RAPD.	43
5	Temperaturas y ciclos evaluados para el análisis genómico con RAPD.	44
6	Porcentaje de sobrevivencia en los cultivos de <i>B. purpurea</i> después de 6 meses de la conservación <i>in vitro</i> en los diferentes tratamientos planteados para el crecimiento mínimo.	47
7	Incremento (Δ) altura (mm), número de hojas y número de raíces de brotes de <i>B. purpurea</i> a los 3 meses de conservación <i>in vitro</i> en los diferentes tratamientos planteados para el crecimiento mínimo.	50
8	Valores P obtenidos en el ANOVA de altura, número de hojas y número de raíces de <i>B. purpurea</i> después de 3 meses de conservación en los tratamientos planteados de crecimiento mínimo <i>in vitro</i> .	50
9	Incremento (Δ) de altura (mm), número de hojas y número de raíces de brotes de <i>B. purpurea</i> a los 4 meses de conservación <i>in vitro</i> en diferentes tratamientos de crecimiento mínimo.	51
10	Valores P obtenidos en el ANOVA de altura, número de hojas y número de raíces de <i>B. purpurea</i> después de 4 meses de conservación en crecimiento mínimo <i>in vitro</i>	52
11	Número de brotes de <i>B. purpurea</i> formados en los diferentes tratamientos de crecimiento mínimo durante la conservación <i>in vitro</i> .	53

- 12** Valores P obtenidos en el ANOVA de número de brotes de *B. purpurea* formados en la conservación en crecimiento mínimo *in vitro*. 54
- 13** ANOVA de número de brotes de *B. purpurea* después de 6 meses de conservación en crecimiento mínimo *in vitro*. 55

ÍNDICE DE FIGURAS

No. figura		Página
1	Estrategia experimental de los estudios de crecimiento mínimo de <i>B. purpurea</i> .	35
2	Cultivo <i>in vitro</i> de brotes <i>B. purpurea</i> (A) antes de la conservación; (B) en crecimiento mínimo.	36
3	Representación grafica del diseño 2^2 con tres puntos centrales.	38
4	Formación <i>in vitro</i> de brotes <i>B. purpurea</i> después de 3 meses de conservación en medio MS al 75% y sacarosa 1% (tratamiento 2).	48
5	Cultivo <i>in vitro</i> de brotes <i>B. purpurea</i> después de 3 meses de conservación en los diferentes tratamientos de crecimiento mínimo.	49
6	Cultivo <i>in vitro</i> de brotes <i>B. purpurea</i> después de 6 meses de conservación en los diferentes tratamientos de crecimiento mínimo.	54
7	Gráfico de pareto de los efectos de la disminución de la fuerza iónica de sales MS en la concentración de sacarosa sobre el número de brotes después de 6 meses de conservación de <i>Bletia purpurea</i> (Lam.)	55
8	Gráfico de los efectos principales: disminución de la fuerza iónica de sales MS y de la concentración de la sacarosa sobre el número de brotes después de 6 meses de conservación de <i>Bletia purpurea</i> (Lam.)	56
9	Grafico de interacción entre la fuerza iónica las de sales MS y la concentración de sacarosa sobre el número de brotes después de 6 meses de conservación de <i>B. purpurea</i> (Lam.).	57
10	Cultivo <i>in vitro</i> de brotes <i>B. purpurea</i> después de 6 meses de conservación en crecimiento mínimo en medio MS 75% y sacarosa 1%.	58

11	Cultivo <i>in vitro</i> de brotes <i>B. purpurea</i> después de 6 semanas en medio de regeneración	59
12	Patrones RAPD de <i>B. purpurea</i> generados de brotes <i>in vitro</i> no conservados (T) y conservados en crecimiento mínimo 2: 75% MS, 1% sacarosa (CM2) y 4: 75% MS, 3% sacarosa (CM4) con secuencias iniciadoras arbitrarias (OBD 2, OBD 7, OBD 8 y OBD 11). El marcador de peso molecular (M) se indica en pares de bases	61
13	Protocolo para la conservación <i>in vitro</i> en condiciones de crecimiento mínimo de <i>Bletia purpurea</i> (Lam.) y evaluación de la estabilidad genética	63

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
ANA	Ácido naftalenacético
BAP	6- Bencilaminopurina
CETAB	Bromuro hexadeciltrimetil amonio
FAO	Food and Agricultural Organization
IBA	Ácido indolbutírico
IITA	Instituto Internacional de Agricultura Tropical
MS	Murashige y Skoog
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RAPD	Amplificación aleatoria del ADN polimórfico
RFLP	Polimorfismo de la longitud de fragmentos de Restricción

RESUMEN

La familia *Orchidaceae* es una de las más grandes y con mayor diversidad en el reino vegetal, se estima que existen aproximadamente 800 géneros y alrededor de 25,000 especies (Arditti, 1992; Dreesler, 1993; Espejo *et al.*, 2002; Dixon *et al.*, 2003). A pesar de ser una de las familias más grandes, las poblaciones de las orquídeas han disminuido notablemente, debido principalmente a la alteración y destrucción del hábitat, llegando a ocasionar que un gran número de especies se encuentren en peligro de extinción (IUCN /SSC Orchid Specialist Group, 1996; Sosa y Platas, 1998; Ávila y Oyama, 2002). *Bletia purpurea* (Lamarck) DC es considerada una especie bajo amenaza, debido principalmente a la urbanización y alteración de su hábitat; la disminución de sus poblaciones hace necesario buscar alternativas para su conservación (Dutra *et al.*, 2008). La conservación *in vitro* constituye parte esencial de la estrategia general de conservación de recursos genéticos en todo el mundo. Esta vía de conservación puede efectuarse a través del método basado en el *crecimiento mínimo* que consiste en modificar las condiciones óptimas de cultivo ya sea cambiando la composición de nutrientes minerales y fuente de carbono (Rayas *et al.*, 2002). La metodología de crecimiento mínimo tiene la finalidad de disminuir la velocidad de crecimiento normal de la especie objeto de estudio, con lo cual se reduce la frecuencia de transferencia de las plantas a medio de cultivo fresco (García *et al.*, 2007). Con el objetivo de establecer las condiciones de *crecimiento mínimo* para la conservación *in vitro* de germoplasma de *B. purpurea*, se evaluó el efecto de la disminución de la concentración de las sales del medio basal MS (Murashige and Skoog, 1962), se evaluó al 75, 50 y 25% y el efecto de la concentración de la fuente de carbono evaluándose sacarosa al 1, 2 y 3% sobre el crecimiento *in vitro* de brotes. Los resultados obtenidos indican que los cultivos pueden conservarse por un periodo de 6 meses sin subcultivos cuando en el medio de cultivo se disminuye a 75% la fuerza iónica de las sales y se suplementa con 1 ó 3% de sacarosa. Lo anterior se estima en una reducción en la formación de brotes y una tasa de sobrevivencia de 100%. También se evaluó la capacidad de regeneración del material recuperado del cultivo de crecimiento mínimo, lográndose la formación de nuevos brotes al ser transferidos a un medio de cultivo regular. Para demostrar que el método de conservación de germoplasma por cultivo en medios de crecimiento mínimo es viable, se realizó un análisis de la estabilidad genética de los brotes cultivados por 6 meses en los medios de crecimiento mínimo seleccionados. Para ello se utilizó la técnica de amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD). Los resultados obtenidos demostraron que los brotes conservados en medio de crecimiento mínimo no mostraron variaciones genéticas cuando se comparó su perfil genético con el de las plantas cultivadas en medio MS completo con 3% de sacarosa.

ABSTRACT

The family Orchidaceae family is one of the largest and most diverse in the plant kingdom, it is estimated that there are approximately 800 genera and about 25,000 species (Arditti, 1992; Dreesler, 1993, Espejo *et al.*, 2002, Dixon *et al.*, 2003). Despite being one of the largest families, populations of orchids have decreased significantly, mainly due to habitat alteration and destruction, leading to cause a large number of species are endangered (IUCN / SSC Orchid Specialist Group, 1996, Sosa and Platas, 1998, Avila and Oyama, 2002). *Bletia purpurea* (Lamarck) DC is considered a species under threat, mainly due to urbanization and habitat alteration, due to reduction of their populations is necessary to find alternatives for their preservation (Dutra *et al.*, 2008). In vitro conservation is an essential part of the overall strategy for conservation of genetic resources. This way of conservation can be made through the method based on minimum growth is to change the optimal culture conditions either by changing the composition of mineral nutrients and carbon source (Rayas *et al.*, 2002). The goal of minimal growth methodology is to slow the normal growth of the species under study, thereby reducing the frequency of transfer from plants to fresh medium (García *et al.*, 2007). With the aim of establishing the minimum conditions for conservation of germplasm of *B. purpurea*, we evaluated the effect of decreasing the concentration of salts in the MS basal medium (Murashige and Skoog, 1962), was evaluated at 75, 50 and 25% and the effect of the concentration of carbon source, sucrose was evaluated at 1, 2 and 3% of the in vitro growth of shoots. The results indicate that crops can be kept for a period of 6 months without subculturing when the medium was reduced to 75% ionic strength of salts and supplemented with 1 or 3% sucrose. This is estimated at a reduction in shoot formation and survival rate of 100%. We also evaluated the regenerative capacity of the material recovered from the culture of minimal growth, achieving the formation of new shoots when transferred to regular culture medium. To demonstrate that the method of conservation of minimum growth is feasible, analyses of genetic stability of the shoots grown for 6 months in minimal growth media were selected. We used the technique of random amplification of polymorphic DNA (RAPD). The results showed that the shoots kept in minimum growth medium showed no genetic variation at least when I compare their genetic profile with that of plants grown on full MS medium with 3% sucrose.

I. INTRODUCCIÓN

México es considerado uno de los cuatro países con mayor diversidad biológica en el mundo. En cuanto al componente vegetal, nuestro país es el cuarto país más rico en número de especies de plantas con flores. Se ha sugerido que esta alta diversidad es producto de su posición geográfica y de su marcada heterogeneidad geológica, topográfica, climática y altitudinal, lo que ha generado una enorme diversidad de ambientes (McNeely *et al.*, 1990). México, al igual que otros países neotropicales poseedores de una gran orquideoflora, sufre de una severa alteración de ecosistemas, afectando a muchas poblaciones silvestres (Soto, 1994).

En nuestro territorio existen cerca de 1,200 especies de orquídeas (Espejo *et al.*, 2002), lo que representa aproximadamente el 6% del total mundial, de las cuales el 40% son endémicas (Soto, 1994) y de estas, pueden ser encontradas poco más del 10% en la Península de Yucatán. En el estado de Campeche se calcula que hay alrededor de 95 especies de orquídeas (Sánchez *et al.*, 2002).

Las orquídeas son afectadas por la constante destrucción de su hábitat. Debido a las necesidades medio ambientales para su reproducción, algunas de ellas necesitan determinadas especies de insectos o micorrizas para su desarrollo (Sánchez *et al.*, 1998), tienen una baja tasa de crecimiento y ciclos de vida relativamente largos, lo que ha contribuido junto con el saqueo ilegal a ocasionar que un gran número de ellas se encuentren en peligro de extinción (IUCN /SSC Orchid Specialist Group, 1996; Sosa y Platas, 1998; Ávila y Oyama, 2002; SEMARNAT, 2002; Salazar y Mata, 2003; Rodríguez *et al.*, 2005).

Bletia Ruiz & Pav. es uno de los géneros de orquídeas que podemos encontrar en nuestro país; este genero tiene aproximadamente 40 especies (Brown, 2005) una de las cuales, *Bletia purpurea* (Lamarck) DC se encuentra en México y en países de América Central, Sudamérica, y las Antillas (Ackerman, 1995; Palestina y Sosa, 2002; Sosa y Díaz-Dumas, 1997). *B. purpurea* es una especie bajo amenaza, debido a que la urbanización y de la alteración de su hábitat ha disminuido sus poblaciones, por lo que se hace necesario buscar alternativas para su conservación (Dutra *et al.*, 2008).

La conservación *ex situ* del germoplasma de especies vegetales se logra principalmente con el uso de los bancos de germoplasma, los cuales son centros orientados al almacenamiento mediante propágulos de una parte representativa de la variabilidad genética correspondiente a una determinada especie. Dentro de esta categoría se encuentran los bancos de cultivo *in vitro* (Iriondo, 2001).

Las principales finalidades de la conservación *in vitro* son las siguientes: (1) mantener la estabilidad genética, (2) evitar los riesgos del subcultivo regular, (3) lograr su aplicación a un amplio rango de genotipos, (4) permitir la propagación a gran escala, (5) facilitar el intercambio del material entre países e instituciones, y (6) desarrollar una tecnología económica y sencilla que disminuya la cantidad de trabajo (Fay y Clemente, 1997).

Esta vía de conservación puede efectuarse a través de dos métodos: el crecimiento mínimo y la criopreservación. El método basado en el *crecimiento mínimo* es el más generalizado, se basa en modificar las condiciones óptimas de cultivo, para disminuir la velocidad de crecimiento normal de la especie objeto de estudio, con lo cual se reduce la frecuencia de transferencia de las plantas a medio de cultivo fresco (García *et al.*, 2007). Para reducir la velocidad de crecimiento de las plantas *in vitro* es necesario alterar las condiciones óptimas de cultivo. Para ello se realizan modificaciones en la composición del medio de cultivo, como pueden ser, entre otras, la disminución del contenido mineral y de la fuente de carbono (Rayas *et al.*, 2002).

Por otro lado, se debe considerar que durante la conservación es preciso garantizar la estabilidad genética de los materiales. Por tal razón, las plantas conservadas *in vitro* deben ser evaluadas y/o monitoreadas para determinar sus niveles de estabilidad genética. Esto ha sido realizado considerando dos clases de marcadores genéticos: los morfológicos o agronómicos y los moleculares. No obstante, el uso de marcadores morfológicos en las plantas tiene muchas limitantes, pues su expresión puede estar sujeta a factores ambientales o fenológicos; solo es posible evaluarlos a nivel de toda la planta y cuando esta llega a su estado adulto. Por otro lado, gracias a los avances en la biología molecular se han desarrollado métodos de identificación y caracterización basados en el uso de marcadores moleculares que superan, en la gran mayoría de los casos, las limitaciones de los métodos tradicionales (Rao, 2004).

Los marcadores moleculares basados en ácido desoxirribonucleico (ADN) se definen como segmentos particulares de ADN que evidencian polimorfismos que puede localizarse en una región codificante o no codificante, y revelan la ocurrencia de cambios genéticos entre dos o más individuos (Palombi y Damiano, 2002; Picca *et al.*, 2004; Azofeifa-Delgado, 2006) y que idealmente son representativos a nivel del genoma completo (Agarwal *et al.*, 2008). Entre los diferentes marcadores de ADN, el método Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD, por sus siglas en inglés) genera patrones de bandas polimórficas, producidas por iniciadores de secuencias arbitrarias a través de la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El método RAPD es simple, de bajo costo, no requiere de marcadores radioactivos y utiliza cantidades mínimas de ADN y genera gran cantidad de información sobre los genomas analizados (Xena de Enrech, 2000); éstos han sido

utilizados para el análisis de la estabilidad genética *in vitro* en *Curcuma longa* (Tyagi *et al.*, 2007), *Billbergia rosea* (Pardo *et al.*, 2008) y fresa (Hassan y Bekheet, 2008), entre otras especies.

Considerando lo anterior el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la disminución en la fuerza iónica de las sales MS (Murashige y Skoog, 1962) y de la fuente de carbono (sacarosa) en el medio de cultivo sobre el crecimiento *in vitro* de brotes, con el fin de establecer las condiciones de *crecimiento mínimo* adecuadas para la conservación *in vitro* de germoplasma de *Bletia purpurea* (Lam.) y comprobar la estabilidad genética de las plantas después de la conservación, mediante la técnica RAPD.

II. ANTECEDENTES

2.1 FAMILIA ORCHIDACEAE

Orchidaceae es la familia más grande y diversa de las plantas con flores, que consiste en 25,000 especies en 800 géneros (Singh *et al.*, 2007). Debido a su facilidad de hibridación, actualmente existen más de 150,000 híbridos registrados, muchos de los cuales son multigenéricos (Tsavkelova *et al.*, 2001). Esta familia de plantas posee características avanzadas desde el punto de vista evolutivo, motivo por el cual se encuentra en pleno proceso de diversificación, circunstancia que se ve reflejada en la abundancia y diversidad de especies. Crecen en todos los continentes, excepto en la Antártida, y viven en diferentes hábitats. La mayoría de ellas proceden de regiones tropicales y subtropicales, pero también prosperan en climas casi desérticos, en la tundra y en elevadas montañas. La floración de algunas orquídeas se limita estrictamente a una estación, mientras que otras pueden florecer intermitentemente durante el año (Bellido, 2007).

En términos generales, estas plantas constan de raíces, tallos que casi siempre están modificados en pseudobulbos, hojas y flores, en algunas especies se observa la presencia de rizomas. Las flores son la parte más distintiva de la planta y es esencial para la definición y diferenciación de las especies; generalmente brotan en la punta o a lo largo de un pedúnculo que recibe el nombre de escapo floral, constan de tres sépalos y tres pétalos, los cuales, en la mayoría de los casos, están poco diferenciados por lo técnico se les llama tépalos. Los pétalos son dos iguales y un tercero es diferente, el cual recibe el nombre de labelo. Los órganos reproductores femeninos y masculinos están unidos en una sola estructura que recibe el nombre de columna. El polen de estas flores forma masas compactas que recibe el nombre de polinios, los cuales casi siempre se presentan en pares (Sánchez *et al.*, 1998).

La gran mayoría de las orquídeas cultivadas son epífitas, es decir, crecen sobre los árboles, a los que utilizan únicamente como soporte, ya que no son plantas parásitas. También existen orquídeas litófilas (que crecen sobre rocas) y terrestres, que crecen directamente en el suelo. Se distinguen, además, por su patrón de crecimiento: las orquídeas *monopodiales*, principalmente epífitas, desarrollan un único tallo y raíces aéreas, mientras que la *simpodiales* se propagan mediante rizomas, unas raíces extendidas que producen pseudobulbos de los que brotan los tallos. La mayoría de las orquídeas simpodiales son terrestres. Las orquídeas de regiones frías y templadas por lo general son terrestres, mientras que las epífitas crecen generalmente en regiones cálidas (Bellido, 2007).

Las diferencias que puedan presentar las plantas en cuanto a color o tamaño, ya sea de la flor o de otras partes como los tallos o las hojas no son importantes para la diferenciación

de las especies. Los únicos parámetros útiles para la diferenciación de especies se basan en la estructura de la flor (Sánchez *et al.*, 1998).

El fruto de las orquídeas es una cápsula dehiscente, es decir que abre solo al madurar y esparce las semillas. Las semillas de las orquídeas son conocidas usualmente como semillas polvo, ya que son muy pequeñas y contienen pocas reservas de alimentos (McKendrick, 2000). Se encuentran entre las semillas más pequeñas de todas las plantas con flores, pesan entre 0.3 y 14 μg , y miden de 0.25 a 1.2 mm de largo y 0.09 a 0.27 mm de ancho, son producidas en un gran número, los rangos van entre 1,300 a 4, 000,000 de semillas por cápsula (Arditti, 1967). Las semillas tienen una testa muy dura que cubre al embrión, no poseen endospermo, por lo tanto, prácticamente no tienen material de almacenamiento que puedan ocupar para su propia germinación y crecimiento (Mitchell, 1989), por lo que usualmente no germinan en el medio natural a menos que sean infectadas por un hongo micorriza, el mismo que abastece a las plantas jóvenes con azúcares y nutrientes que necesitan hasta que sean lo suficientemente grandes para producir su propio alimento. Cuando la semilla germina produce una masa indiferenciada de células llamada *protocormo*. Manteniendo las condiciones normales, el protocormo continuará su crecimiento por varias semanas, meses o incluso años dependiendo de la especie hasta que alcance la edad apropiada para producir raíces y hojas. En el caso de orquídeas terrestres, es de vital importancia que la relación orquídea-hongo se conserve durante los estados tempranos del ciclo de vida de la planta ya que el protocormo enterrado no puede producir alimento por sí mismo. Por otro lado, los protocormos de las orquídeas epífitas son comúnmente verdes, lo que les posibilita producir parte de su alimento. La relación orquídea-hongo no ha sido en su totalidad investigada para el caso de las orquídeas tropicales (McKendrick, 2000).

2.1.1. ORQUÍDEAS DE MÉXICO

Las orquídeas son indicadores del grado de evolución y conservación de un ecosistema. Los requerimientos especiales demandados por las orquídeas para su supervivencia, por mencionar algunos son: polinizadores específicos, las micorrizas que hacen posible la germinación de las semillas, los árboles donde algunas orquídeas crecen si ser parasitas, determinados niveles de humedad, un balance especial entre luz y sombra, de cinco a siete años para alcanzar su madurez, de lo cual es posible concluir que a una mayor presencia de especies de orquídeas, corresponde una masa forestal menos perturbada, que ha permitido que se establezcan el máximo número de especies (Sánchez *et al.*, 2002).

A pesar de que la familia de las orquídeas es una de las más grandes, sus poblaciones han disminuido notablemente, estos cambios se deben principalmente a la alteración y destrucción del hábitat, además muchas de las poblaciones silvestres son seriamente afectadas por el volumen de individuos que se extraen para satisfacer la demanda comercial de que son objeto debido a que son altamente apreciadas como especies ornamentales. Lo anterior trae como consecuencia el lento o nulo restablecimiento de las poblaciones, debido a que presentan una baja tasa de crecimiento, ciclos de vida relativamente largos y escaso reclutamiento de nuevos individuos bajo condiciones naturales, llegando a ocasionar que un gran número de ellas se encuentren en peligro de extinción (IUCN /SSC Orchid Specialist Group 1996; Sosa y Platas, 1998; Ávila y Oyama, 2002).

La rareza y belleza de las orquídeas han atraído la atención de muchos horticultores y/o coleccionistas, en muchos casos las poblaciones de diversas especies han sufrido colectas exhaustivas para satisfacer el comercio, éste tráfico ilegal de ejemplares silvestres ha aumentado principalmente desde la segunda mitad del siglo XX, teniendo como consecuencia que muchas poblaciones naturales hayan disminuido considerablemente, de hecho en algunos casos, poblaciones enteras han desaparecido (Betchtel *et al.*, 1981; IUCN/SSC Orchid Specialist Group, 1996; Ospina, 1996; Hágsater y Soto, 2001).

La conservación de orquídeas no es una tarea fácil y principalmente en países tropicales como México, donde se encuentran la mayor diversidad de especies y es también donde la problemática es más grave. En México la alteración del hábitat y la colecta excesiva de orquídeas ha conducido a que 182 especies de orquídeas actualmente se encuentren dentro de algún estatus de conservación; se considera que una especie está extinta en el medio silvestre, 16 en peligro de extinción, 58 amenazadas y 107 sujetas a protección especial (SEMARNAT, 2002). En un gran número de mercados públicos en todo México existe una venta masiva de individuos colectados ilegalmente, en donde es posible encontrar especies en peligro de extinción, por lo que esta actividad se ha convertido en una de las principales causas de la disminución del número de individuos y poblaciones de las especies de orquídeas mexicanas (Hágsater y Soto, 2001; Salazar, 2003). En muchas ocasiones el uso que se le da a estas especies es únicamente durante el periodo de floración, una vez que la flor se marchita, es muy frecuente que la planta sea desechada. En otras ocasiones el poco conocimiento que la gente tiene sobre el cultivo de las plantas, hace casi imposible la supervivencia de la misma.

En este contexto, la conservación y uso sustentable de germoplasma valioso se ha planteado como una medida inaplazable y prioritaria; la conservación se puede englobar en dos grandes puntos: Se ha intentado realizar una efectiva conservación *in situ* a través del mantenimiento de áreas naturales protegidas, realizando programas de recuperación de

especies, restauración de hábitats, control de especies invasoras y manejo de poblaciones de plantas y ecosistemas; sin embargo, cuando lo anterior no es posible llevar a cabo con éxito, o se pretende reforzar los esfuerzos realizados, se puede recurrir a la conservación *ex situ*; en este sentido los jardines botánicos y otras instituciones de investigación, tienen una importante función, buscando rescatar el germoplasma amenazado mediante el mantenimiento de colecciones vivas, estableciendo bancos de semillas, suministrando material para diferentes propósitos con el fin de eliminar o reducir la presión de colecta de que son objeto, cultivando aquellas especies con semillas recalcitrantes que no pueden ser mantenidas en bancos de semillas y a través de la propagación, multiplicación y conservación a través de las técnicas de cultivo de tejidos (Tinoco y Mata, 2007).

2.1.2. ORQUIDEAS NATIVAS DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN

Las especies epifitas de la Península de Yucatán, tales como las orquídeas, las bromelias, y las aráceas, se ven cada día más presionadas y amenazadas por las actividades de origen antropocéntrico, tales como el cambio de uso del suelo para actividades de agricultura y ganadería, así como por los efectos de perturbaciones naturales, tales como huracanes e incendios forestales (Sánchez *et al.*, 2000).

La familia Orquidaceae tiene un potencial económico muy alto, en virtud de lo cual, sus especies han sido objeto de continuo saqueo de su ambiente natural, tanto por coleccionistas como por horticultores (Sánchez *et al.*, 2000), si a ello le agregamos las perturbaciones de las áreas forestales como es el caso de los desmontes con fines agropecuarios, los incendios forestales y aun los fenómenos naturales como huracanes y tormentas, que propician la destrucción de muchas plantas y, por supuesto, de especies, ya que al tratarse de plantas que establecen fuertes interrelaciones con su entorno, se ven seriamente afectadas cuando hay un cambio en alguno de los factores asociados, tales como, desaparición del hospedero, del polinizador y de los árboles donde crecen, mayor insolación, menor humedad, entre otros (Sánchez *et al.*, 2002).

El Estado de Campeche es especialmente importante para todos los interesados en la conservación de las orquídeas nativas. Antes que nada, porque las ya reportadas para el Estado son la mayoría de las especies reportadas en la Península de Yucatán, lo cual demuestra la alta “capacidad geográfica” de Campeche para el crecimiento de las orquídeas. Entre las principales características que hacen especial al Estado es el contar con un sistema ribereño (El Candelaria), único en la península y con una de las más grandes e importantes tierras bajas en América (La Laguna de Términos), así como contar con

inmensas extensiones de bosque tropical, cuya composición florística depende fuertemente de la precipitación anual, lo que hace que se presenten tanto selvas bajas y medianas, como selvas altas. En otras palabras Campeche ofrece una gran variedad de ecosistemas, la mayoría de las cuales tienen una alta capacidad para la propagación natural de las especies silvestres (Sánchez *et al.*, 2000). Otra razón primordial de porqué este estado es particularmente importante es que, de todos los estados de la República Mexicana, Campeche tiene el más alto porcentaje de su territorio (aproximadamente el 30%), bajo el estatus de áreas protegidas (Sánchez *et al.*, 2002).

Existen orquídeas de muy diversas formas y tamaños, generalmente son apreciadas por la vistosidad de sus flores o por la belleza de su follaje. Dentro de la Península de Yucatán, en general, y en particular en el estado de Campeche se encuentra *Bletia purpurea* (Lam.), orquídea terrestre considerada amenazada, debido principalmente a las amenazas de la urbanización y de la alteración de su hábitat; la disminución de sus poblaciones hace necesario buscar alternativas para su conservación (Dutra *et al.*, 2008).

2.1.3. GENERO *BLETIA* RUIZ Y PAVÓN

Subfamilia: Epidendroideae Lindley

Tribu: Arethuseae Lindley

Subtribu: Bletiinae Benth

Sinonimias:

Bletiana Rafinesque

Gyas Salisb.

Jimenesia Rafinesque

Regnellia B. R.

Thiebautia Colla

Descripción botánica. **Plantas:** hierbas erectas terrestres. **Pseudobulbos:** subglobosos, epigeos o hipógeos, ocasionalmente similares a tubérculos. **Hojas:** plicatas, pecioladas y articuladas; tiene pocas hojas plagadas que salen de un pseudobulbo. **Inflorescencia:** en la mayoría de las especies es un racimo simple o ramificado, siendo muy numerosos, rara vez solitarios, los escapos salen en forma lateral de los pseudobulbos, sin hojas usualmente de la parte apical del cormo. **Flores:** brotan sucesivamente durante un periodo largo de tiempo; el color de las flores varía del rosa-liláceo al verdoso o blanco. **Sépalos:** casi iguales, los

sépalos laterales, apenas conados y gibosos en la base. **Pétalos:** son similares al sépalo dorsal. **Labelo:** libre, erecto, entero o trilobulado, la base usualmente esta contraída, a veces un poco gibosa, los lobulos laterales usualmente son amplios, paralelos o con sus puntas abiertas, el lóbulo central es erecto o recurvado, casi siempre retuso o bilobado, el disco casi siempre es laminado. **Columna:** elongada, en forma de semiterete, alada, casi siempre con dos aurículas en la base, sin pie o con un pie corto; la antera es operculada e incumbente; con ocho polinios cerosos (Sánchez *et al.*, 2002).

Distribución. Son nativas de América, extendiéndose desde la Florida y México, donde esta su centro de dispersión, hasta Brasil (Sánchez *et al.*, 2002).

Observaciones: El genero *Bletia* fue descrito por los botánicos Ruíz y Pavón, en el año de 1883. Las flores en muchas ocasiones no se abren completamente. *Bletia* contiene un buen numero de vistosas y bonitas especies terrestres aunque, rara vez, pueden ser semi-epífitas o litófitas (Sánchez *et al.*, 2002).

2.1.4. BLETIA PURPUREA (LAM.) DC

Descripción botánica: **Plantas:** terrestres o litófitas, glabras, erectas, con un corto cormo, Pseudobulbos: comprimidos en la parte superior, de 3.8 cm de diámetro máximo, casi siempre producidos en largas cadenas, subterráneos o parcialmente expuestos, con pocas hojas. **Hojas:** de lineales a estrechamente elíptico-lanceolada, plicatas, largamente acuminadas, la parte más baja envainando al escapo, de 20 a 90 cm de largo y de 1 a 5 cm de ancho. **Inflorescencia:** abierta, con pocas o muchas flores, un racimo simple o paniculado, que nace de un pedúnculo lateral largo y delgado; el pedúnculo esta provisto con vainas tubulares remotas de 0.27 a 1.7 m de largo y las brácteas florales principalmente pequeñas, de ovado-triangulares a ovado-lanceoladas, de agudas a acuminadas, de 2 a 8 mm de largo. **Flores:** rosas, rosa-púrpura o púrpura oscuro, rara vez casi blancas, vistosas, con ovarios delgados pedicelados, de 9 a 18 mm de largo, variable en tamaño, generalmente abren en forma sucesiva. **Sépalos:** sépalo dorsal de oblongo-elíptico a ovado-lanceolado, de semiobtusos a agudo, de 1.5 a 2.6 de largo y de 5 a 9 mm de ancho; sépalos laterales de oblicuamente ovado-oblongo a elíptico-oblongo de abruptamente agudos a acuminados, márgenes involutos, de 1.2 a 2 cm de largo y de 5 a 8 mm de ancho. **Pétalos:** de oblicuamente ovado-oblongos a elípticos u oblongo-lanceolados, de obtusos a agudos, de 1.2 a 2.1 de largo y de 7 a 11 mm de ancho, forman una capucha sobre el labelo. **Labelo:** ampliamente cordado, ovado-cordado o cordado-semicuadrado, cuando esta extendido hacia afuera, conspicuamente trilobulado encima de la parte media, fuertemente recurvado

en sus posición natural, con la base truncada o subauriculada, de 1 a 1.8 cm de largo y de 8 a 14 mm de ancho, a través de los lóbulos laterales, los cuales son incurvados en sus posición natural, ampliamente redondeados en la base, con el ápice de ahusado, a triangular-obtuso o redondeado; el lóbulo medio suborbicular, de truncado a profundamente emarginado en el ápice, márgenes ondulado-crenulados, de 5 a 10 mm de ancho; disco venoso, con cinco a siete laminillas que se extienden de cerca de la base del labelo hasta cerca del ápice del lóbulo medio, con dos laminillas más cortas sobre los lóbulos laterales.

Columna: fuertemente arqueada, clavelada, con alas laterales estrechas de 8 a 12 mm de largo. **Fruto:** una capsula oblicuamente cilíndrica, erecta, rojiza a chocolate-marrón, con 2 a 4.5 cm de largo y 8 a 10 mm de diámetro (Sánchez *et al.*, 2002).

Hábitat: Se encuentran en bosques secos y en llanuras, también pueden encontrarse en la base de troncos de árboles, sobre trozas y tocones en pantanos, o flotando en agua, sobre grupos de hierbas o pastos, en altitudes de hasta 2000 m.s.n.m. (Sánchez *et al.*, 2002).

Distribución: Se distribuye en México, La Florida, Las Antillas, Centroamérica y Colombia, Venezuela y Guyana (Sánchez *et al.*, 2002).

Observaciones: Se le ha encontrado en suelo fangoso, sumergida en agua. En Campeche se le localiza en “sascaberas” (cierto tipo de mina de roca caliza que se extrae para recubrimiento de caminos), en la parte sureste del estado, en los límites con los estados de Quintana Roo. También se le puede encontrar creciendo en colonias bien adaptadas en los taludes de las carreteras, los que generalmente tienen material tipo “sascab” (Sánchez *et al.*, 2002).

2.2. CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA VEGETAL

La conservación de germoplasma vegetal como actividad científica fue propuesta en los años 70 del siglo XX con el objetivo de prevenir la erosión genética y mejorar la productividad agrícola de muchas especies a partir de la conservación de diferentes especies y genes de interés. Existen dos estrategias básicas para la conservación de germoplasma vegetal, la conservación *in situ* y la conservación *ex situ* (Nodarse *et al.*, 1998).

En la conservación *in situ* las especies se mantienen en su hábitat natural, generalmente en parques nacionales, reservas biológicas y reservas ecológicas. Mientras que, en la conservación *ex situ* las especies se preservan fuera de su hábitat natural, en bancos de semillas botánicas, bancos de plantas en campo o en bancos de plantas *in vitro* (García *et al.*, 2007).

Los bancos de semillas botánicas resultan de gran utilidad en especies que se propagan sexualmente y cuyas semillas se mantienen viables durante un largo período de almacenamiento, pero no deben aplicarse para conservar especies de plantas con semillas botánicas de corta supervivencia, ni pueden emplearse en caso de trabajar con plantas autoincompatibles, o plantas de propagación vegetativa obligada. En estos casos, la diversidad genética de estas especies se puede conservar mediante bancos de plantas en campo o mediante técnicas de conservación *in vitro* (Graudal *et al.*, 1997).

Los bancos en condiciones de campo tienen como limitante que se necesitan grandes extensiones de tierra, los costos por mantenimientos asociados a las labores agrotécnicas son altos, se hace necesario controlar plagas y enfermedades y además son vulnerables a los desastres climáticos. Es por ello, que el desarrollo de nuevas técnicas de conservación, han permitido preservar mejor los recursos genéticos importantes para muchos países (Ortiz, 2000).

En particular, los avances alcanzados en el cultivo *in vitro* en diferentes especies vegetales dieron la posibilidad de desarrollar nuevas alternativas para la conservación *ex situ*, al permitir disponer de suficientes individuos en períodos de tiempo relativamente cortos y facilitar la manipulación del material vegetal al ser plantas con un desarrollo fisiológico homogéneo. Desde entonces, la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal constituyó una herramienta de trabajo que apoyó la conservación de semillas botánicas y la conservación en campo, ya que permitió tener duplicados seguros de aquellos genotipos de particular interés (Engelmann y Takagi, 2000).

Esta *vía* de conservación puede efectuarse a través de dos métodos: el crecimiento mínimo y la criopreservación. El método basado en el crecimiento mínimo es el más generalizado, se basa en modificar las condiciones óptimas de cultivo, para disminuir la velocidad de crecimiento normal de la especie objeto de estudio, con lo cual se reduce la frecuencia de transferencia de las plantas a medio de cultivo fresco (García *et al.*, 2007) .

A mediados de los años 90 del siglo XX, la conservación de germoplasma vegetal implicó además, la inmersión directa de los explantes en nitrógeno líquido (criopreservación) y dentro de este método de conservación, el procedimiento de vitrificación demostró ser el más efectivo y empleado por muchos autores (Hirai y Sakai, 2003; Wang y Deng, 2004; Caccavale *et al.*, 2005).

2.2.1. IMPORTANCIA DE LA CONSERVACIÓN *IN VITRO* DE GERMOPLASMA VEGETAL

La conservación *in vitro* constituye parte esencial de la estrategia general para la conservación y el intercambio de recursos fitogenéticos a nivel mundial. La misma ofrece la posibilidad de almacenar un elevado número y variedad de muestras en un área reducida y facilita el acceso a ellas para su evaluación. Sus condiciones asépticas garantizan mayor sanidad de las muestras y en consecuencia permiten incrementar el intercambio de materiales vegetales sanos. Sin embargo, para establecer cualquier estrategia de conservación *in vitro*, se hace indispensable el dominio de una metodología de propagación que garantice altos porcentajes de supervivencia (García *et al.*, 2007).

El principal objetivo de los bancos de germoplasma *in vitro* es conservar las especies que presentan semillas botánicas de corta y poca viabilidad, cultivos de propagación vegetativa o clonal, o que son altamente heterocigóticos y requieren ser propagados vegetativamente para conservar su integridad genética. También se han incluido raíces y tubérculos de corta vida en el proceso de almacenamiento, como *Solanum tuberosum* L. (papa), *Ipomoea batata* L. (boniato) y *Manihot esculenta* Crantz (yuca) (Frankel, 1995).

2.2.2. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN *IN VITRO*

Existen dos métodos de conservación *in vitro* cuyo uso varía en dependencia de la duración que requiera el almacenamiento. Para corto o mediano plazo el objetivo es reducir la velocidad de crecimiento del material vegetal, en este caso, puede ser empleado el método

de crecimiento mínimo, por su parte la criopreservación garantiza la conservación *in vitro* por períodos prolongados de tiempo (García *et al.*, 2007).

2.2.3. MÉTODO DE CRECIMIENTO MÍNIMO

Este método se le conoce también como crecimiento reducido pues se basa en la disminución de la división celular y el metabolismo de la planta. Tiene como objetivos incrementar la longevidad *in vitro* de los cultivos sin que se produzcan cambios genéticos, por tanto, no hay una detención total de los procesos celulares sino una disminución en la velocidad con que ocurren los mismos y así se reduce la frecuencia de transferencia de las plantas a medio de cultivo fresco (Roca *et al.*, 1994). Constituye una de las principales variantes que puede garantizar el éxito de un programa de conservación, debido a que es relativamente sencillo y puede ser establecido con facilidad con el equipamiento que normalmente existe en un laboratorio de cultivo de tejidos (García *et al.*, 2007). El principal objetivo de la preservación de germoplasma es limitar el número de subcultivos y mantener la diversidad genética de una especie en una condición estéril sin poner en peligro la estabilidad de la planta (Shibli *et al.*, 2006).

El método de crecimiento mínimo ha sido ampliamente utilizado en la práctica para la conservación de germoplasma, existen varios ejemplos de su aplicación en la creación de bancos *in vitro*. Entre otros, se pueden mencionar los casos de *Saccharum* sp. (caña de azúcar) (Taylor y Dukin, 1993), yuca (Roca *et al.*, 1994) y papa (Toledo y Golmirzaie, 1998). Resulta de interés ya que si el cultivo *in vitro* se mantiene en condiciones normales (crecimiento continuo), los subcultivos deberán hacerse en intervalos que oscilan de varios días a varios meses, dependiendo del tipo de cultivo y de las especies. Además, en estas circunstancias, los subcultivos están expuestos a un continuo riesgo de pérdidas por accidente o contaminación, a lo que hay añadir el riesgo de alteraciones genéticas (Phillips *et al.*, 1994; Lynch, 1999; Pence, 1999).

La reducción del crecimiento de las plantas conservadas *in vitro* tiene varias ventajas: el espacio requerido para el almacenamiento de los materiales *in vitro* es relativamente pequeño comparado a lo que se necesita en campo, por lo que permite mantener miles de genotipos en cuartos de crecimiento pequeños, el deterioro del cultivo puede ser detectado visualmente y la pérdida de viabilidad puede evitarse, las plantas se conservan libres de enfermedades y del ataque de plagas por lo que elimina la necesidad de procedimientos de cuarentena largos y pueden ser utilizadas para el intercambio internacional de germoplasma

(Uyoh *et al.*, 2003), el porcentaje de multiplicación es alto y las pérdidas de germoplasma debido a desastres naturales puede evitarse (Dodds, 1991).

Para reducir la velocidad de crecimiento de las plantas *in vitro* es necesario alterar las condiciones óptimas de cultivo, lo cual puede lograrse a través del uso de una estrategia o de la combinación de varias estrategias:

- *Reduciendo las concentraciones de azúcar, sales o minerales.* La relación entre la concentración de carbohidratos y los componentes nitrogenados del medio nutritivo pueden tener efectos sobre las tasas de crecimiento y la morfogénesis en los cultivos *in vitro* (Staritsky, 1980; Rayas *et al.*, 2002).
- *Usando temperaturas de cultivo bajas.* La temperatura de almacenamiento depende de la sensibilidad al frío de las especies. Las temperaturas en el rango de 0-5 °C se emplean en especies tolerantes al frío, pero para las especies tropicales que generalmente son sensibles al frío, que se utilizan las temperaturas son entre 15 ° y 20 °C (Rao, 2004).
- *Por la adición de osmóticos.* Los agentes osmóticos son materiales que reducen el potencial hídrico de las células. Esta condición de estrés puede inhibir tanto el crecimiento de callos como la formación de brotes. La adición de osmóticos al cultivo ha demostrado su eficacia en la reducción del crecimiento e incrementa la vida de almacenamiento de muchos tejidos crecidos *in vitro* de diferentes especies de plantas. El manitol, la sacarosa, el sorbitol principalmente, se han reportado como osmóticos que aumentan la vida de almacenamiento de tejidos *in vitro* (Shibli *et al.*, 2006).
- *Por las modificaciones del ambiente gaseoso.* La reducción del crecimiento puede lograrse mediante la reducción del nivel de oxígeno. Existen varios métodos para disminuir la cantidad de oxígeno disponible para los tejidos. Lo más sencillo es cubrir los tejidos con aceite mineral. Esta técnica fue desarrollada en primer lugar por Caplin en 1959 con callos de zanahoria, y ha sido empleada con éxito recientemente en la conservación a medio plazo (Engelmann, 1991).
- *Variando el régimen de luz.* La intensidad y calidad de la luz, son otros factores importantes en el control de la velocidad de crecimiento, especialmente en su interacción con la temperatura, que como ya se ha expresado, es otro de los factores más utilizados en la conservación mediante el método de crecimiento mínimo (García *et al.*, 2007).

Entre estas alternativas, el uso de bajas temperaturas y la manipulación de los componentes del medio de cultivo son las más aconsejables desde un punto de vista práctico, por su eficiencia y simplicidad (Lynch, 1999).

Prácticamente cualquier parte de la planta podría ser utilizado como explante en el establecimiento de cultivos para el almacenamiento, aunque los mejores resultados se han obtenido utilizando meristemos apicales, yemas axilares, embriones y gametos (Uyoh *et al*, 2003). Generalmente, los cultivos organizados, como los brotes, son utilizados para el almacenamiento en crecimiento mínimo ya que los tejidos indiferenciados como los callos, son más vulnerables a la variación genética (Rao, 2004).

Aunque los procedimientos de crecimiento mínimo se han desarrollado para una amplia gama de especies, generalmente éstos son utilizados para la conservación de recursos genéticos de sólo unas pocas especies como *Musa spp.*, Papa, batata, yuca, ñame, *Allium spp.* y especies de árboles de clima templado. Aproximadamente 37, 600 accesiones han sido reportadas en conservación mediante técnicas *in vitro* en los bancos de genes, en todo el mundo (FAO, 1996).

2.2.4. APLICACIONES DEL MÉTODO DE CRECIMIENTO MÍNIMO

En España se han utilizado las técnicas de almacenamiento *in vitro* mediante crecimiento mínimo en *Centaureum rigualii*, *Coronopus navasii*, *Lavatera oblongifolia*, *Limonium calaminare*, *Limonium catalaunicum*, *Limonium dufourii*, *Limonium estevei* y *Limonium gibertii* (Iriando y Pérez, 1999; Martín, 1993). Las mejores condiciones de almacenamiento se consiguieron a 5°C en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) sólo o suplementado con 4.44 µM benciladenina (BAP) adicionado con 0.54 µM ácido naftalenacético (ANA).

Mediante el uso de métodos de crecimiento mínimo, el Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA) mantiene actualmente un banco de germoplasma de cerca de 1,500 accesiones de papa. Algunos de los ejemplos de la versatilidad de esta metodología se mencionan a continuación. (1) *Ahorro de espacio*: Tomes (1979) almacenó 100 genotipos de *Lotus corniculatus* utilizando 0.24 m³ de espacio, mientras que si hubiera mantenido los genotipos en cultivo *in vitro* normal el área necesaria del cuarto de crecimiento hubiera sido de 18 m³ y si hubiera mantenido estos mismos genotipos en campo el área requerida hubiera sido de 400 m³, Dodds (1991) reportó que se pueden mantener 3,500 accesiones, cada una con plántulas contenidas en 10 tubos de ensaye, en un cuarto de cultivo de un área de 3.2 x 2.4 x 2.9 m³; (2) *Evitar pérdidas por condiciones*

climáticas adversas: Tomes (1979) reportó que 34 genotipos bajo estudio en campo se perdieron en su totalidad a causa del invierno, mientras que los 100 genotipos mantenidos *in vitro* se conservaron en su totalidad.

La modificación en la composición de los medios de cultivo es una forma de limitar el crecimiento, por ejemplo, el crecimiento *in vitro* de plantas de yuca disminuyó proporcionalmente con el contenido de nitrógeno total del medio de cultivo; concentraciones por debajo de 10 mM, en término de número de tallos y nudos por tallos resultaron perjudiciales (Roca *et al.*, 1994).

Autores como García *et al.* (2004) conservaron, con calidad y durante seis meses sin realizar subcultivos, plantas *in vitro* de caña de azúcar, con la reducción de las sales MS entre 25 y 50% de su concentración normal.

Martin y Pradeep (2003) desarrollaron un protocolo simple, barato, eficaz y libre de contaminación para la conservación *in vitro* a plazo prolongado de *Ipsea malabarica* (Reichb. f.) JD Hook, una orquídea endémica y en peligro del oeste de Kerala de Ghats, La India, a nivel de planta completa. El medio MS a la mitad de su concentración sin reguladores de crecimiento ni azúcar (fotoautotrófico) fue el mejor para la conservación *in vitro* y su tiempo de almacenamiento fue de 27 meses. En este medio, los brotes crecieron muy lentamente y rara vez desarrollaron otros brotes y estuvieron libres de contaminación.

Bhat y Chandel (1993), reportaron que la concentración osmótica del medio de cultivo puede reducir la velocidad del crecimiento de las plantas cultivadas *in vitro*, esto se logra por la adición de osmóticos no metabolizables como el manitol y el sorbitol al medio de cultivo.

En 2007, Goncalves y Romano reportaron un protocolo de crecimiento mínimo *in vitro* de *Drosophyllum lusitanicum* (L.); los cultivos pudieron ser efectivamente conservados bajo crecimiento mínimo a 5°C por 8 meses en medio MS suplementado con 60 gdm⁻³ de sacarosa, 20 gdm⁻³ de manitol y 0.91 µM de kinetina sin ningún subcultivo. Los brotes multiplicaron normalmente (similar a aquellos cultivos no almacenados) sin perder su capacidad de regeneración y sin cambios morfológicos aparentes.

Igualmente González (2007) desarrolló un protocolo de crecimiento mínimo de *Capsicum chinense* Jack. Los resultados mostraron que a los 100 días de cultivo en medio MS y MS a la mitad de su fuerza iónica con la adición de osmoreguladores como el manitol o sorbitol redujeron el crecimiento de las plántulas, utilizando como explante yemas apicales con las

hojas cotiledonares reducidas a la mitad y el mejor tratamiento es el que estuvo compuesto por el medio de cultivo MS, suplementado con manitol o sorbitol al 1.5%.

Bertrand *et al.* (1992), estudiaron la respuesta de microesquejes de cafeto en presencia de diferentes concentraciones de sacarosa y su interacción con la temperatura, ellos observaron que las bajas concentraciones redujeron el crecimiento, enraizamiento y porcentaje de supervivencia, después de siete meses de conservados a 20 °C. Los mejores resultados los obtuvieron en un medio de cultivo que contenía como mínimo 20 g/L de sacarosa y una temperatura para el crecimiento de 20 °C.

Por su parte, Panis *et al.* (1996) indujeron la formación de brotes meristemáticos en *Musa sp.* en presencia de altas concentraciones de 6- bencilaminopurina (BAP) y los brotes fueron más resistentes a las bajas temperaturas que los propios meristemas.

Suksa *et al.* (1997) lograron altos porcentajes de supervivencia en ápices *in vitro* de *Carica papaya* L. (papaya), después de 12 meses de conservación a 16 °C y comprobaron que la adición 5.0 µM de ácido absícico al medio de cultivo influyó satisfactoriamente en la disminución del crecimiento de los ápices. Estos autores observaron además, una severa suculencia de los ápices de papaya conservados en medio de cultivo que contenía manitol y comprobaron que la adición de altas concentraciones de sacarosa al medio de cultivo no mejoró la resistencia de los ápices al frío.

De igual forma, García *et al.* (2004) redujeron el crecimiento en longitud de plantas *in vitro* de caña de azúcar con el incremento de la concentración de manitol en el medio de cultivo, de esta forma las plantas se pudieron conservar durante 12 meses consecutivos a una temperatura de 15 °C.

Eventualmente en los cultivos conservados *in vitro*, debido a las bajas temperaturas, la alta concentración osmótica, la reducción de la concentración de sales inorgánicas y la presencia de inhibidores del crecimiento, se puede producir un oscurecimiento de los tejidos, seguido por defoliación. Esto se atribuye a la oxidación fenólica y a la inducción de senescencia por la presencia de determinadas concentraciones de gases como el etileno, especialmente cuando se utilizan frascos pequeños o han sido sellados herméticamente. Roca *et al.* (1994), observaron una disminución de la defoliación y una reducción de la tasa de crecimiento a la mitad, en dos variedades de yuca, al adicionar al medio de cultivo un 0.25% de carbón activado.

2.3. ESTABILIDAD GENÉTICA DEL GERMOPLASMA

Un problema asociado a las técnicas *in vitro* es la posible ocurrencia de variación genética, entendiéndose ésta como la aparición de variación genética en el material vegetal a consecuencia del cultivo *in vitro* (Scowcroft, 1985). Este problema, existente en las diversas aplicaciones de las técnicas de cultivos de tejidos *in vitro*, cobra especial importancia en la conservación de especies amenazadas, en donde lo que se pretende es conservar la diversidad genética original procedente de una población natural (Fay *et al.*, 1999; Pence, 1999; Iriondo, 2001). Al respecto Roca *et al.* (1994) describe: “El material recuperado de la conservación *in vitro* debe representar genéticamente el material utilizado y cualquier sistema de cultivo *in vitro* será inaceptable si introduce un alto riesgo de inestabilidad genética o de selección entre genotipos o de ambas cosas”.

La variación genética es heredable y se le asocia con rearrreglos cromosomales, deleciones y mutaciones (Sánchez-Teyer *et al.*, 2003, Noro *et al.*, 2007). Además de la tasa normal de variación, propia de las células vegetales en condiciones normales, formando parte de un tejido, en un órgano y planta intactos, existen factores externos, propios del cultivo *in vitro*, que pueden inducir acumulación de variaciones genéticas y epigenéticas, que se manifiestan en el fenotipo. Algunos factores externos son: método de cultivo *in vitro* y patrón de desarrollo, edad del cultivo y subcultivos y algunos componentes del medio de cultivo (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2009).

Los sistemas de cultivo de tejidos presentan diferentes niveles de riesgo de variación genética. Roca *et al.* (1994) propone el siguiente orden de tipo de cultivo según el nivel de riesgo: cultivo de meristemos, micropropagación nodal, embriones somáticos y yemas adventicias; por ultimo, los más inestables, en teoría, son los cultivos de células y protoplastos. Igualmente, entre las dos estrategias de conservación *in vitro* (el crecimiento lento y la criopreservación) hay posibilidades de variación debido a la posible regeneración de yemas adventicias. Por otra parte en los procesos de renovación de cultivos (subcultivos) del material conservado bajo crecimiento lento, hay posibilidades de seleccionar los mejores explantes o más vigorosos por parte de la persona que realiza estos procesos, lo cual no es recomendable (Roca *et al.*, 1994).

El problema puede ser minimizado mediante una cuidadosa selección del material vegetal de partida y de los medios de cultivo, y la evaluación genética del material micropropagado y/o conservado (Iriondo y Pérez, 1996; Lynch, 1999).

Para la detección de variaciones genéticas en plantas están disponibles una serie de métodos de cribado (screening). Estos incluyen los *análisis del fenotipo*, la *citometría de*

flujo, los sistemas de isoenzimas, y el uso de marcadores moleculares (Sarasan et al., 2006).

Entre las ventajas de los marcadores moleculares que se basan en el ADN esta la de ser técnicas precisas y objetivas para identificar genotipos y marcar genes o regiones del cromosoma que están relacionados con rasgos genéticos como resistencia a enfermedades, color del fruto, etcétera. No son afectados por el ambiente, ya que aunque las plantas estén sujetas a condiciones extremas y variadas, la información genética no cambia y es constante en cualquier parte de la planta y en cualquier estado de desarrollo. Además el número de marcadores moleculares es ilimitado. Lo anterior permite evaluar diversidad y estabilidad en los materiales colectados y de las colecciones almacenadas, a la vez, permiten identificar accesiones repetidas e innecesarias dentro de las colecciones (Mendoza-Herrera y Simpson, 1996).

Los marcadores moleculares son usados ampliamente para detectar y caracterizar variación genética a nivel de ADN; de las técnicas disponibles tal como isoenzimas, RFLP (Polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción) y RAPD (Amplificación aleatoria del ADN polimórfico), los marcadores RAPD es uno de los más útiles ya que un gran número de muestras pueden ser analizadas rápida y económicamente utilizando únicamente micro-cantidades de material, los amplicones de ADN son independientes de la expresión ontogénica y muchas regiones genómicas pueden ser muestreadas con un número potencialmente ilimitado de marcadores (Isabel *et al.*, 1993).

2.3.1. MARCADORES MOLECULARES BASADOS EN ADN

Los marcadores moleculares basados en ADN se definen como segmentos particulares de ADN que evidencian polimorfismos que puede localizarse en una región codificante o no codificante, y revelar la ocurrencia de cambios genéticos entre dos o más individuos (Palombi y Damiano, 2002; Picca *et al.*, 2004; Azofeifa-Delgado, 2006) y que idealmente son representativos a nivel del genoma completo (Agarwal *et al.*, 2008). Para su aplicación, el ADN extraído es digerido por enzimas específicas (Jaligot *et al.*, 2000), o bien, se amplifican utilizando imprimadores definidos, o combinando ambos procedimientos (Sahijram *et al.*, 2003; Prado *et al.*, 2007). Los resultados son visualizados como patrones de bandas en un gel (Al-Zahim *et al.*, 1999; Jaligot *et al.*, 2000). Como se mencionó anteriormente, los marcadores moleculares se han utilizado principalmente en estudios de diversidad genética, pero en algunos casos también para el estudio de estabilidad genética

en el cultivo y conservación de plantas *in vitro* (Araújo *et al.*, 2001, Patzak, 2003, Sahijram *et al.*, 2003).

Picca *et al.* (2004) clasifican las técnicas basadas en marcadores moleculares de ADN de acuerdo con la naturaleza del procedimiento que conllevan en: (1) Marcadores basados en hibridación del ADN, (2) Marcadores basados en la amplificación de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y (3) Marcadores mixtos que utilizan métodos de hibridación y amplificación.

2.3.1.1. MARCADORES MOLECULARES BASADOS EN PCR: AMPLIFICACIÓN ALEATORIA DEL ADN POLIMÓRFICO (RAPD)

La PCR está basada en la síntesis de millones de copias de un fragmento de ADN comprendido entre secuencias complementarias a dos oligonucleótidos llamados oligonucleótidos (también conocidos como primers). Este proceso es realizado por una enzima ADN polimerasa termoestable (Aravanopoulos, 2003, Picca *et al.*, 2004).

La RAPD consiste en la amplificación de secuencias de ADN con un oligonucleótido de una longitud de 10 bases con secuencia aleatoria (decámero), que se hibrida con el ADN (Williams *et al.*, 1990, Araújo *et al.*, 2001). Posteriormente, los fragmentos de ADN son separados según su movilidad electroforética y visualizados en un gel de agarosa o poliacrilamida (Hames y Rickwood, 1990, Williams *et al.*, 1990). Este último tiene mayor resolución. Diferencias en el patrón de bandas detectadas entre individuos evidencia diferencias en su secuencia de bases (Picca *et al.*, 2004). Esta técnica es simple y efectiva, y permite determinar los polimorfismos en gran cantidad de muestras (Martín *et al.*, 2002). Sin embargo, muchas veces es necesario evaluar gran cantidad de oligonucleótidos antes de encontrar aquellos que son informativos (Nunome *et al.*, 2001, Feuser *et al.*, 2003, Gostimsky *et al.*, 2005).

Williams *et al.* (1990) denominan el método que describen como “Random Amplified Polymorphic DNA” (RAPD) y a los polimorfismos que se producen proponen llamarlos “marcadores RAPD”. Lo destacan como un proceso simple basado en la amplificación de ADN genómico con oligonucleótidos (uno por reacción PCR) de secuencia de nucleótidos arbitraria, que detecta polimorfismos que funcionan como marcadores genéticos. Los oligonucleótidos propuestos por Williams *et al.* fueron de 9 ó 10 bases de longitud y una composición en G+C entre 50% y 80%. Cada oligonucleótido amplifica por PCR varios segmentos de ADN (detectados por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de

etidio) y en muchos de ellos aparecen polimorfismos entre las especies analizadas (tanto de organismos procariotas como de eucariotas). Otra importante particularidad que señalan estos autores respecto a la mayoría de los marcadores RAPD es su carácter dominante: no es posible distinguir cuando un segmento de ADN ha sido amplificado a partir de un locus heterocigoto u homocigoto. En los raros casos en que los marcadores RAPD son codominantes se observan como segmentos de diferentes tallas amplificados a partir de un mismo locus. Como aplicaciones del método RAPD, Williams *et al.* (1990) proponen la elaboración de mapas genéticos, aplicaciones reproductivas en plantas y animales y como productor de marcadores moleculares en estudios de genética de poblaciones.

El método RAPD fue adoptado de inmediato por su simplicidad, bajo costo y por utilizar cantidades mínimas de ADN; el polimorfismo detectado puede deberse a un simple cambio de una base, inserciones o deleciones (indels), que modifican o eliminan el sitio de alineación del oligonucleótidos; o también inserciones en la secuencia genómica que separan los sitios de inserción del oligonucleótido a una distancia que no permite la amplificación (la distancia máxima de inserción de las dos copias del oligonucleótidos no deben exceder 2500 pb para lograr la amplificación del segmento). Los RAPDs proveen una enorme fuente de datos y por lo tanto pueden ser más informativos acerca de la estructura de las poblaciones y su diversidad genética que las isoenzimas (Campbell *et al.*, 1999). Las bandas generadas se pueden clasificar de acuerdo a su intensidad de tinción (fuerte, mediana, débil) frente al bromuro de etidio, lo cual puede ser un reflejo de la especificidad de la amplificación (Xena de Enrech, 2000).

El análisis RAPD requiere de cinco elementos básicos: 1). ADN genómico: ADN proveniente del organismo a analizar. 2). El oligonucleótidos: con la propiedad de localizar y unirse a sitios complementarios del ADN desnaturalizado, debe tener un contenido de al menos un 50% de guanina-citocina para funcionar correctamente. 3). Desoxirribonucleótidos: se requiere de concentraciones adecuadas de dATP, dGTP, dCTP y de dTTP para la síntesis de la nueva cadena de ADN. 4). Amortiguador. 5). Taq-polimerasa: es una enzima ADN polimerasa ADN dependiente termoestable. Tiene la propiedad de sintetizar la doble cadena de ADN usando una cadena simple como molde a partir de un punto determinado, fijado en este caso, por el oligonucleótido. Durante el análisis RAPD se dan una serie de reacciones químicas en forma cíclica de manera similar a lo que ocurre en una reacción PCR pero contemplando la modificación mencionada anteriormente. La eficiencia de los marcadores RAPDs puede estar influenciada por varios factores, entre ellos: El número de ciclos de amplificación, la cantidad de ADN inicial, la longitud del ADN, el oligonucleótido y la temperatura (Azofeifa-Delgado, 2006).

2.3.2. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA DE GERMOPLASMA CONSERVADO *IN VITRO* MEDIANTE RAPDs

La variación genética originada durante la conservación *in vivo* e *in vitro* ha sido detectada por marcadores RAPD en diversas especies vegetales como *Musa sp.* (Damasco *et al.*, 1996); *Allium sp.* (Al-Zahim *et al.*, 1999); *Digitalis sp.* (Nebauer *et al.*, 1999); *Mangifera sp.* (Lowe *et al.*, 2000) y *Lilium sp.* (Varshney *et al.*, 2001), entre otros.

Dentro de la familia de las Bromeliaceae, Pardo *et al* (2008) evaluaron mediante la técnica RAPD, la estabilidad genética de brotes de *Billbergia rosea*, procedente de ápices caulinares, sometidos a cinco regímenes de conservación bajo condiciones de crecimiento mínimo: ½ MS, ½ MS + 30 g/L sacarosa, ¼ MS, ¼ MS + 30 g/L sacarosa. El análisis determinó que de los brotes almacenados por un periodo de 9 meses sin subcultivo, sólo aquellos almacenados en ¼ MS con sacarosa mostraron un perfil electroforético similar a las plantas adultas (plantas madre) lo que indica su estabilidad genética con un promedio de supervivencia del 86%.

Hassan y Bekheet (2008) reportaron un protocolo de conservación de brotes de fresa a plazo medio y el análisis de su estabilidad genética mediante RAPDs después de 15 meses de conservación. La conservación fue realizada a 4°C en condiciones de oscuridad usando brotes crecidos *in vitro* en medio Knop's, con y sin Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV) (Ácido indolbutírico; IBA; 1mg/L) y suplementado con diferentes concentraciones de manitol y sorbitol (0.1, 0.2 y 0.4 M). La conservación fue mejor en el medio con 0.2 M de sorbitol sin IBA, con una tasa de sobrevivencia de 76.2% y una tasa de reconversión a plántula de 100%. Los perfiles de amplificación del material preservado fue comparado con explantes *in vitro* no preservados. En este estudio el análisis de los marcadores RAPD no mostró ninguna variación entre el material preservado y no preservado.

Tyagi y colaboradores (2007) reportaron un protocolo para la conservación *in vitro* de turmeric (*Curcuma longa* L.), utilizando fuentes de carbono (azúcar comercial) y gelificantes de bajo costo (isabgol, también llamado isubgol). Para todos los experimentos se tomaron brotes de cultivos de 4 semanas de edad y se cultivaron en medio MS + 2.5 mg/L N⁶ benciladenina (BA). En base a los resultados, los autores recomiendan para la conservación *in vitro* el medio MS + 2.5 mg/l BA suplementado con azúcar comercial y gelificado con isabgol, con una alta supervivencia de los cultivos de hasta 12 meses (56 y 50%, respectivamente). El análisis RAPD no mostró variación significativa en los perfiles de las plantas madres y las plántulas conservadas *in vitro* en ninguno de los medios de bajo costo, ni tampoco, en el medio control.

A pesar de la gran información que existe sobre el uso de marcadores moleculares, es poca la información que se tiene sobre su aplicación en la conservación de germoplasma para evaluar la estabilidad genética de plantas cultivadas *in vitro* en medios de crecimiento mínimo dentro de la familia Orquidaceae. Por lo tanto, en el presente trabajo se propone el uso de marcadores RAPD, para analizar la estabilidad genética de plantas de *B. purpurea*, que se considera como especie bajo amenaza (Dutra *et al.*, 2008) y que ha sido cultivada en dichas condiciones.

III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

Si se establece un protocolo a partir de cultivo *in vitro*, mediante la disminución en el medio de cultivo de la concentración de la fuerza iónica y de la fuente de carbono, en el cual los brotes de *Bletia purpurea* (Lam.) puedan ser mantenidos por prolongados periodos de tiempo sin que se requieran subcultivos frecuentes y sin que se presenten variaciones genéticas, entonces sería posible conservar el germoplasma de esta especie bajo condiciones de *crecimiento mínimo*.

3.2 OBJETIVO GENERAL

Establecer un protocolo de *crecimiento mínimo* para la conservación *in vitro* de germoplasma de *Bletia purpurea* (Lam.), orquídea nativa del Estado de Campeche y evaluar la estabilidad genética.

3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de la disminución en la concentración de sales del medio de cultivo MS sobre el crecimiento *in vitro* de brotes de *Bletia purpurea*.
2. Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de sacarosa sobre el crecimiento *in vitro* de brotes de *Bletia purpurea*.
3. Analizar la estabilidad genética en los brotes de *Bletia purpurea* conservados *in vitro* en condiciones de crecimiento mínimo, mediante la técnica RAPD.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

La estrategia experimental para la conservación *in vitro* de la orquídea, *Bletia purpurea* (Lam.) se esquematiza en la Fig. 1. donde se observa el flujo de las actividades realizadas durante el desarrollo de este trabajo. Con el objetivo de establecer las condiciones idóneas para la conservación mediante el método de crecimiento mínimo, se evaluó el efecto de disminuir la fuerza iónica de las sales MS (Murashige y Skoog, 1962) y de la concentración de sacarosa (azúcar comercial) en el medio de cultivo sobre la reducción del crecimiento de los cultivos *in vitro*. En base al menor incremento de altura de planta, número de hojas y raíces y a la menor formación de brotes, durante un periodo de conservación de 6 meses, se seleccionaron los mejores tratamientos de crecimiento mínimo. Después de este periodo el material recuperado de la conservación fue resembrado en medio de regeneración por 6 semanas. Los tratamientos, que en base a las variables mencionadas lograron la mayor reducción del crecimiento, fueron evaluados (después de la regeneración) para determinar sus niveles de estabilidad genética mediante la técnica RAPD.

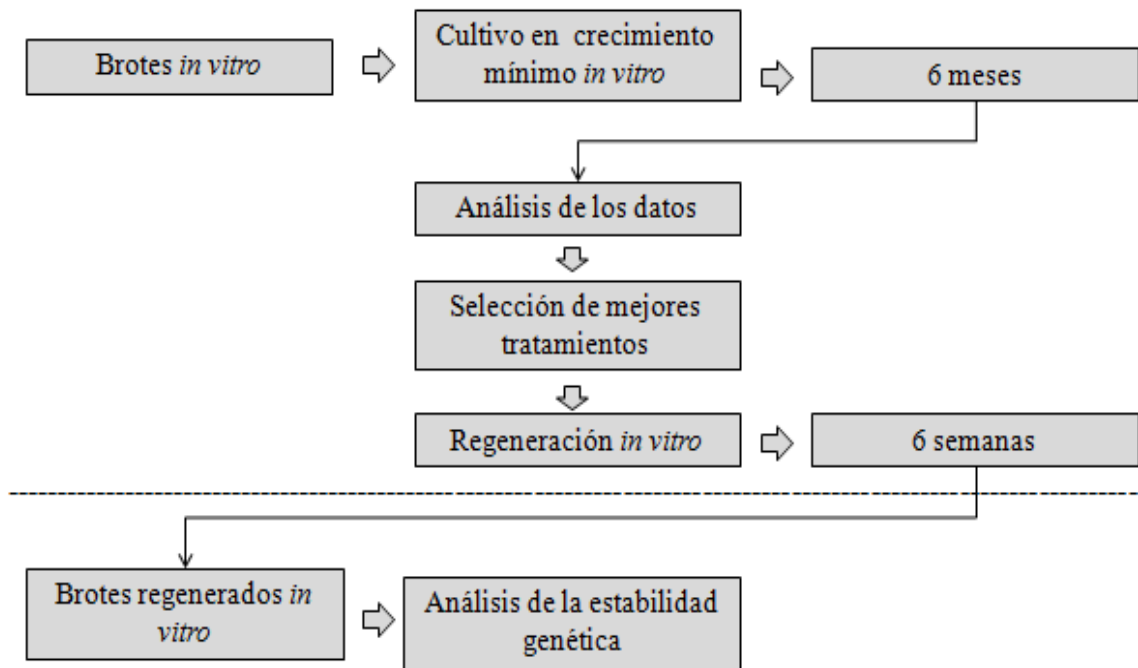


Figura 1. Estrategia experimental de los estudios de crecimiento mínimo de *B. purpurea*.

4.1. MATERIAL VEGETAL

Para los estudios de crecimiento mínimo se utilizaron brotes de *Bletia purpurea* (Lam.) de 3 meses de edad, que se obtuvieron de la germinación *in vitro* de semillas. Para la germinación se utilizó medio MS con 4 μM de bencilaminopurina (BAP), 3% sacarosa y 2 g/L de carbón activado. En la Fig. 2-A se observa la formación masiva de brotes obtenidos de la germinación. Este material se obtuvo en los laboratorios de la Unidad Sureste del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. (CIATEJ). Con el objetivo de homogeneizar la siembra, brotes individuales de 1 a 1.5 cm de altura con 2 a 3 hojas y 1 o 2 raíces fueron seleccionados y separados del medio de germinación y transferidos a los diferentes medios de crecimiento mínimo. En la Fig. 2-B se observa un brote de *Bletia purpurea* en medio de crecimiento mínimo. Después de la siembra, se midió la altura (mm), con un vernier digital, de cada una de los brotes y se contabilizaron hojas y raíces para obtener los datos iniciales, con los cuales al final de cada mes se calculaba el incremento en estas variables para realizar el análisis estadístico.

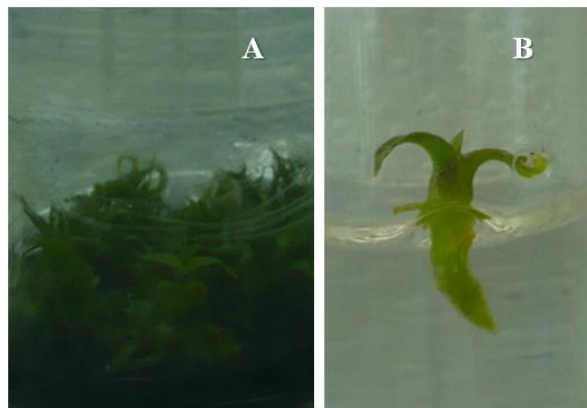


Figura 2. Cultivo *in vitro* de brotes *B. purpurea* (A) antes de la conservación; (B) en crecimiento mínimo.

4.2. COMPOSICIÓN BÁSICA DE LOS MEDIOS DE CONSERVACIÓN EN CRECIMIENTO MÍNIMO Y CONDICIONES DE CULTIVO

La composición básica de los medios para la conservación *in vitro* fue la formulación propuesta por Murashige y Skoog (1962) a diferentes concentraciones de su fuerza iónica, ésta formulación se describe en el Cuadro 1. El medio fue suplementado con distintas concentraciones de sacarosa (azúcar comercial) y gelificado con 2.2. g/L de gel rite. El pH de todos los medios fue ajustado a 5.7 antes de la esterilización. Los recipientes de cultivo

fueron tubos de ensayo (24.2 x 200 mm) conteniendo 20 ml de medio. La esterilización de los medios de cultivo se realizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Las condiciones bajo las cuales se desarrollaron todos los estudios en el cuarto de crecimiento fueron: 25 ± 2°C con 16/8 h de fotoperiodo a una humedad relativa de 55-60%.

Cuadro 1. Composición básica del medio de cultivo MS utilizado en los estudios de conservación.

Componente	mg/L
Macroelementos	
Nitrato de Amonio (NH ₄ NO ₃)	1650.0
Cloruro de Calcio (Ca Cl ₂ •2H ₂ O)	332.2
Sulfato Ferroso (FeSO ₄ •7H ₂ O)	27.8
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄ •7H ₂ O)	180.7
Yoduro de Potasio (KI)	0.83
Nitrato de Potasio (KNO ₃)	1900.0
Fosfato de Potasio (KH ₂ PO ₄)	170.0
Microelementos	
Ácido Bórico (H ₃ BO ₃)	6.2
Cloruro de Cobalto (CoCl ₂ •6H ₂ O)	0.025
Sulfato de Cobre (CuSO ₄ •5H ₂ O)	0.025
Na ₂ -EDTA	37.26
Sulfato de Manganeso (MnSO ₄ •4H ₂ O)	16.9
Ácido Molibdico (MoO ₃)	0.25
Sulfato de Zinc (ZnSO ₄ •7H ₂ O)	8.6

4.3. CULTIVO EN CONDICIONES DE CRECIMIENTO MÍNIMO

La siembra individual de brotes de *B. purpurea* se realizó en diferentes medios de crecimiento mínimo para evaluar el efecto de la disminución de la fuerza iónica de las sales MS y de la concentración de sacarosa. Dicho experimento se realizó considerando un diseño 2² con tres puntos centrales (Fig. 3); las combinaciones de todos los tratamientos se muestran en el Cuadro 2. Los medios de cultivo se gelificaron con 2.2 g/L de gel rite. El pH de todos los medios se ajustó a 5.7 antes de la esterilización. Para la evaluación se llevó a cabo un registro mensual de las variables *altura (mm)*, *número de hojas* y *número de raíces* y se contabilizó el *número de brotes*. Para las variables altura, número de hojas y de raíces el experimento se realizó con 3 replicas y para el número de brotes con 6 replicas.

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías al final del periodo de conservación.

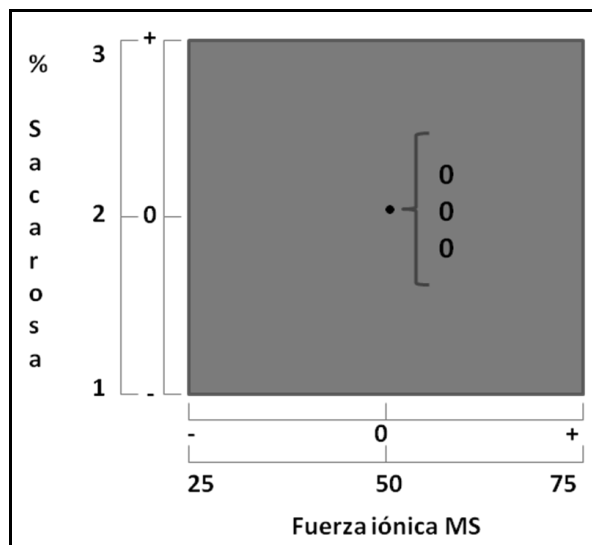


Figura. 3. Representación grafica del diseño 2^2 con tres puntos centrales.

Cuadro 2. Tratamientos de los medios evaluados con variable codificada y real para la conservación *in vitro* de *B. purpurea*.

Número tratamiento	Factores			
	Codificado		Real	
	X ₁	X ₂	MS (%)	Sacarosa (%)
1	-	-	25	1
2	+	-	75	1
3	-	+	25	3
4	+	+	75	3
5	0	0	50	2
6	0	0	50	2
7	0	0	50	2

-: Nivel bajo del factor X₁ ó X₂

+: Nivel alto del factor X₁ ó X₂

0: Punto central.

4.4. REGENERACIÓN *IN VITRO*

Después de mantener el material vegetal de *Bletia purpurea* durante 6 meses en los tratamientos de medio mínimo para su conservación, se seleccionaron los brotes de los tratamientos que dieron mejor resultado y se sembraron en un medio de cultivo para su regeneración con la finalidad de evaluar si las plántulas tenían la capacidad de crecer. A las 6 semanas de la resiembra se evaluó el porcentaje de cultivos que lograron regenerar después de la resiembra. El medio de cultivo para la regeneración consistió de las sales del medio de cultivo MS (Sigma M5519) en la concentración completa (4.4 g/L) y fue suplementado con 3% de sacarosa (azúcar comercial), 2 g/L de carbón activado y gelificado con 2.3 g/L de gel rite. El pH del medio los medios fue ajustado a 5.7 antes de la esterilización. El experimento se llevó a cabo con 6 replicas y el porcentaje de cultivos viables fue calculado a partir del número total de cultivos que lograron regenerar por tratamiento.

4.5. EXTRACCIÓN DE ADN

La purificación del ADN de brotes *in vitro* de *B. purpurea*, se realizó siguiendo el protocolo de Allen *et al.* (2006), el cual se describe a continuación:

Reactivos

- Ribonucleasa A libre-DNAsa
- CETAB, también conocido como bromuro hexadeciltrimetil amonio.
- Etanol absoluto
- Acetato de sodio (NaAc) trihidratado
- Mezcla Fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (25:24:1) (v/v)
- Disodio etilendiamino (EDTA) (EDTA disódico).
- Tris(hidroximetil) aminometano-acido clorhídrico (Tris HCl).
- Tris(hidroximetil) aminometano.
- NaCl (Cloruro de sodio).
- HCl (Ácido clorhídrico).
- NaOH (Hidróxido de sodio).
- 2-Mercaptoetanol.

Soluciones stocks

Stock Tris HCl 1.0 M, pH 8. Hay dos opciones. La 1ª. opción es usar Trizma base y HCl concentrado, en el que se describe el uso de Trizma base 1.0 M, en el cual el pH es reducido usando HCl concentrado. La 2ª. opción utiliza una mezcla de Trizma base y Trizma HCl mezclados en una proporción que resulta en Tris HCl 1.0 M a un pH 8.0 a 25°C.

Stock Trizma base y HCl concentrado. Diluir 121.1 g de Trizma base en 700 ml H₂O. Ajustar el pH a 8.0 usando HCl concentrado. Se requiere 50 ml de HCl concentrado. Aforar a 1.0 litro con H₂O.

Stock Trizma base y Trizma HCl. Diluir 53 g de Trizma base y 88.8 g de Trizma HCl en 700 ml de H₂O para un pH final de 8.0 a 25°C. Aforar a 1.0 litro con H₂O.

Stock de EDTA 5 M. Diluir 186.12 g de EDTA (sales Disodio dihidratado) en 750 ml de H₂O. Añadir 20 g de pellets NaOH y usar una sol.de NaOH 5 M para ajustar el pH final a 8.0.

Stock de NaCl 5 M. Adicionar 292.2 g de NaCl en 700 ml de H₂O y ajustar a 1.0 litro con H₂O.

Buffer TE. Mezclar 10 ml de Tris 1 M, PH 8.0 con 2 ml de EDTA sódico y llevar a un volumen final de 1.0 litro con H₂O.

NaAc 3 M. Mezclar 408.24 g de NaAc con 700 ml de H₂O. Aforar a 1.0 litros con H₂O.

Buffer de extracción. Para preparar 250 ml, mezclar 25 ml de Tris 1 M, pH 8.0, 70 ml de NaCl 5 M, 10 ml de EDTA 0.5 M y 5 g de CTAB, y llevar a un volumen final de 250 ml con H₂O.

Etanol al 70%. Mezclar etanol absoluto y H₂O en una proporción de 70 etanol: 30 H₂O (v/v).

Stock de Ribonucleasa A. Mezclar en H₂O para una concentración final de 10 mg ml⁻¹.

Procedimiento:

1. Precaentar el buffer de extracción en un baño de agua a 65°C (10 min).
2. Macerar sobre hielo, con mortero y pistilo previamente estéril y congelado, 200 mg de tejido vegetal en 1.2 ml de buffer de extracción precalentado. Vaciar el macerado en un tubo eppendorf de 2 ml y mantenerlo en hielo. Agregar en campana 30 µL de 2-Mercaptoetanol. Agitar por 5-10 s para mezclar a fondo.

3. Incubar a 65 °C por 30 min en un baño de agua e invertir los tubos cada 5-10 min para permitir el mezclado.
4. Centrifugar a 13,500 rpm por 10 min a 22°C para remover restos no solubles.
5. Transferir el sobrenadante a tubos eppendorf nuevos y agregar 500 µL de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico.
6. Cerrar los tubos herméticamente y mezclar suavemente por inversión de los tubos por 20 min a 20-22°C.
7. Separar las fases centrifugando la mezcla a 13 500 rpm por 10 min a 22°C en una centrifuga.
8. Transferir cuidadosamente la capa acuosa superior a un tubo eppendorf de 2 ml nuevo y agregar 500 µL de isopropanol (almacenado a -20°C) y mezclar invirtiendo los tubos e incubar a temperatura ambiente por 10 min para precipitar el ADN.
9. Centrifugar la mezcla a 13,500 rpm por 10 min a 22°C.
10. Remover el sobrenadante usando una micropipeta y entonces resuspender el pellet en 250 µL TE a temperatura ambiente.
11. Pipetear 2.5 µL de RNAsa libre-DNAsa dentro de la mezcla de la muestra e incubar a 37°C por 30 min.
12. Pipetear 25 µL DE NaAc 3 M y mezclar. Adicionar 600 µL de etanol preenfriado a -20°C, mezclar e incubar a -20°C por 20 min para precipitar el ADN.
13. Centrifugar la mezcla a 13,500 rpm por 10 min a 22°C.
14. Remover cuidadosamente el sobrenadante por decantación o con una micropipeta y entonces adicionar 500 µL de etanol frio 70% (-20°C). Desprender el pellet.
15. Centrifugar a 13,500 rpm por 10 min a 22°C y remover el etanol 70% sobrenadante, teniendo cuidado de no perturbar el pellet.
16. Seque al aire el ADN para remover los residuos de etanol por 1 hora.
17. Resuspender el pellet en 25 µL de H₂O si el ADN va a ser utilizado para PCR. Si las muestras van a ser almacenadas se recomienda resuspender en TE. Las muestras pueden ser almacenadas a 4 ó a -20°C.

Para el análisis de la estabilidad genética se tomaron al azar, en tres diferentes tubos de cultivo, los brotes obtenidos de la regeneración de los cultivos de crecimiento mínimo de los tratamientos 2 (75% MS, 1% sacarosa) y 4 (75% MS, 3% sacarosa) y como testigo (T) se utilizaron brotes *in vitro* no conservados. El tejido vegetal, así obtenido, se maceró mezclando las diferentes muestras para obtener ADN representativo de cada tratamiento.

4.6. EVALUACIÓN DEL ADN EXTRAÍDO

Se realizó mediante el uso de un espectrofotómetro a una densidad óptica de 260/280 nm (DO 260/280), y se complementó con la electroforesis en gel de agarosa al 1%.

4.7. SELECCIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Para la amplificación al azar del ADN se emplearon 20 oligonucleótidos sintetizados por Sigma Aldrich® (Cuadro 3). Con la finalidad de seleccionar los oligonucleótidos que permitieran la detección de polimorfismos genómicos, se amplificó ADN de los brotes *in vitro* no conservados (testigo) y ADN de brotes obtenidos de la regeneración después del periodo de conservación de los tratamientos 2 (75% MS, 1% sacarosa) y 4 (75% MS, 3% sacarosa), se realizaron 5 repeticiones y para el análisis final se seleccionaron 4 oligonucleótidos, OBD-02, OBD-07, OBD-08, y OBD-11 en base a su reproducibilidad y a la intensidad de bandas que generaron.

Cuadro 3. Secuencias de los oligonucleótidos para la amplificación aleatoria del ADN polimórfico.

Oligonucleótido	Secuencia Nucleotídica 5' a 3'
OBD-01	ACCGCGAAGG
OBD-02	GGACCCAACC
OBD-03	GTCGCCGTCA
OBD-04	TCTGGTGAGG
OBD-05	TGAGCGGACA
OBD-06	ACCTGAACGG
OBD-07	TTGGCACGGG
OBD-08	GTGTGCCCCA
OBD-09	CTCTGGAGAC
OBD-10	GGTCTACACC
OBD-11	AGCGCCATTG
OBD-12	CACCGTATCC
OBD-13	GGGGTGACGA
OBD-14	CTTCCCAAG
OBD-15	CATCCGTGCT
OBD-16	AGGGCGTAAG
OBD-17	TTCCACGG
OBD-18	GAGAGCCAAC
OBD-19	CTGGGGACTT
OBD-20	ACCCGGTCAC

4.8. ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE RAPD

A fin de estandarizar la amplificación de los fragmentos al azar y seleccionar los oligonucleótidos de mejor resolución y reproducibilidad, se seleccionaron varios protocolos para RAPD en orquídeas (Wong y Sun, 1999; Lim *et al.*, 1999; Melo, Barbante y Pimentel, 2006; Kate-ngam y Lakote, 2008; Parab y Krishnan, 2008 y Khosravi *et al.*, 2009) y con ADN genómico de brotes de *B. purpurea in vitro* (testigo) se evaluaron tres concentraciones de ADN (35, 65 y 130 ng), tres de dNTPs (0.2, 1 y 1.5 mM) y dos concentraciones de oligonucleótidos (0.2 y 0.8 μM). Para probar la reproducibilidad se realizaron 3 repeticiones que incluyeron un control negativo (sin ADN). Las condiciones más apropiadas para la amplificación RAPD se muestran en el Cuadro 4.

La PCR fue realizada en un termociclador PXE 0.2 y se probaron distintas temperaturas y ciclos (Cuadro 5), cada prueba se realizó con 3 repeticiones y en base a los mejores resultados de amplificación se eligió el programa 4 para los análisis posteriores. Los productos amplificados fueron separados en un gel de agarosa al 1.5% a 90 V en buffer TAE 1X. El gel fue teñido con 0.1 μml^{-1} de SYBRgreen (Sigma) y las bandas de ADN fueron fotografiadas bajo luz ultravioleta (302 nm). Un marcador de ADN de 100 bp (Bioline) sirvió para determinar la longitud de las bandas observadas. Los perfiles RAPD fueron analizados basándose en la presencia o ausencia de bandas RAPD individuales.

Cuadro 4. Mezcla de reacción utilizada para el análisis genómico con RAPD.

Componentes	Volumen	Concentración final
Buffer PCR 10X	2.5 μl	1X
Mix dNTP 10 mM	0.5 μl	0.2 mM
MgCl ₂ 50 mM	0.75 μl	1.5 mM
Oligo (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM
ADN	0.5-1 μl	60-65 ng
ADN polimerasa Taq Platinum® (Invitrogen)	0.1 μl	1.0 Unidad
H ₂ O	Para 25 μl	

Cuadro 5. Temperaturas y ciclos probados para el análisis genómico con RAPD.

Programa de ciclajes		1		2		3		4	
Desnaturalización inicial	1 ciclo	94°C	5 min	94°C	5 min	94°C	2 min	95°C	5 min
Desnaturalización		92°C	1 min	94°C	1 min	92°C	1 min	92°C	1 min
Alineamiento	40 ciclos	36°C	1 min	40°C	1 min	36°C	1 min	34°C	1 min
Extensión		72°C	1 min	72°C	2 min	72°C	1 min	72°C	1 min
Extensión final	1 ciclo	72°C	10 min	72°C	5 min	72°C	10 min	72°C	10 min

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO IN VITRO DE *B. purpurea* EN DIFERENTES TRATAMIENTOS PLANTEADOS PARA LOGRAR EL CRECIMIENTO MÍNIMO

Existe muy poca información sobre la conservación *in vitro* mediante la técnica de crecimiento mínimo de orquídeas nativas, y mucho menos para especies que, hasta la fecha, carecen de valor comercial, como *B. purpurea*. Se ha generado información sobre la propagación de orquídeas terrestres nativas y en peligro de extinción, pero se ha estudiado muy poco sobre los métodos de conservación *in vitro*. En este estudio los cultivos de *B. purpurea* fueron conservados bajo condiciones de crecimiento mínimo con un 100% de sobrevivencia después de 6 meses de conservación *in vitro* (Cuadro 6) y no se presentaron pérdidas de material vegetal por contaminación del medio. El crecimiento logró limitarse disminuyendo la fuerza iónica de las sales MS y la concentración de sacarosa en el medio de cultivo.

Cuadro 6. Porcentaje de sobrevivencia en los cultivos de *B. purpurea* después de 6 meses de la conservación *in vitro* en los diferentes tratamientos planteados para el crecimiento mínimo.

Número tratamiento	Factores				No. replicas inicial	No. replicas final	Sobrevivencia (%)
	Codificado		Real				
	X ₁	X ₂	MS (%)	Sacarosa (%)			
1	-	-	25	1	6	6	100
2	+	-	75	1	6	6	100
3	-	+	25	3	6	6	100
4	+	+	75	3	6	6	100
5	0	0	50	2	6	6	100
6	0	0	50	2	6	6	100
7	0	0	50	2	6	6	100

5.1.1. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS PLANTEADOS PARA EL CRECIMIENTO MÍNIMO *IN VITRO* EN LA ALTURA, NÚMERO DE HOJAS Y NÚMERO DE RAÍCES DE *B. purpurea*

El monitoreo y la evaluación de las variables *altura de la planta*, *número de hojas* y *número de raíces* solo fue posible hasta el cuarto mes de conservación, después de este periodo la formación múltiple de brotes (Fig. 4), impidió el registro de dichas variables y los brotes inicialmente colocados en las condiciones de conservación murieron, sin embargo los brotes jóvenes garantizaron la supervivencia del material vegetal conservado. Para el análisis estadístico del efecto de la disminución de la fuerza iónica de sales MS y de la sacarosa en el medio de cultivo sobre dichas variables se calculó la diferencia en el incremento mensual (Δ) de la altura, número de hojas y raíces a los 3 y 4 meses de conservación.



Figura 4. Formación *in vitro* de brotes *B. purpurea* después de 3 meses de conservación en medio MS al 75% y sacarosa al 1% (tratamiento 2).

Después 3 meses de conservación *in vitro* (Fig. 5) los resultados obtenidos en las mediciones de las variables (Cuadro 7) fueron sometidos al ANOVA. El ANOVA indicó que las diferencias en el incremento de altura de planta entre los tratamientos debidas al efecto de la disminución de la fuerza iónica de sales MS ($P>0.05$) y de la sacarosa ($P>0.05$) y de la interacción entre ambos factores ($P>0.05$) no es estadísticamente significativa, es decir, no hay diferencia entre tratamientos (Cuadro 8). Igualmente los valores P obtenidos para las variables número de hoja y número de raíces indican que no hay diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos debidos a los factores antes señalados (Cuadro 8).

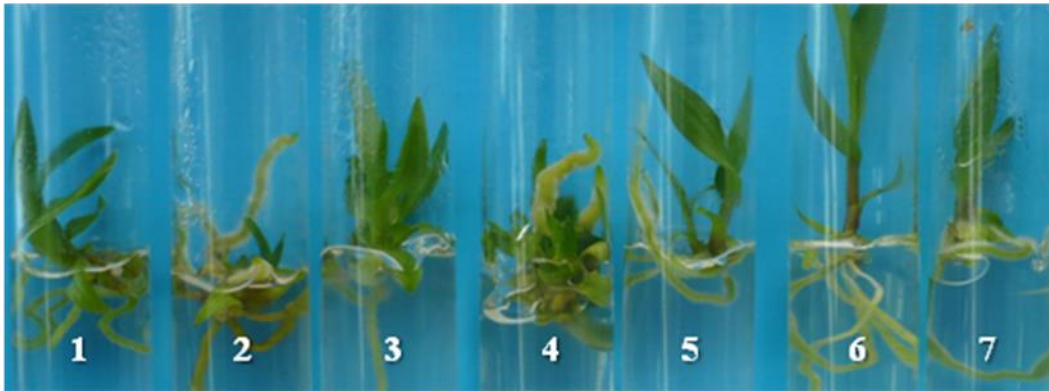


Figura 5. Cultivo *in vitro* de brotes *B. purpurea* después de 3 meses de conservación en los diferentes tratamientos de crecimiento mínimo: 1 (25% MS, 1% sacarosa), 2 (75% MS, 1% sacarosa), 3 (25% MS, 3% sacarosa), 4 (75% MS, 1% sacarosa), 5-7 (50% MS, 2% sacarosa).

Cuadro 7. Incremento (Δ) altura (mm), número de hojas y número de raíces de brotes de *B. purpurea* a los 3 meses de conservación *in vitro* en diferentes tratamientos planteados para el crecimiento mínimo.

Tratamiento	Replica	Factores				Δ Mes 3			
		Codificado		MS	Real		mm Altura	Número Hojas	Número Raíces
		X ₁	X ₂		Sacarosa				
1	1	-	-	25	1	2.8	0	1	
	2	-	-	25	1	4.2	0	6	
	3	-	-	25	1	2.1	0	2	
2	1	+	-	75	1	6.1	0	1	
	2	+	-	75	1	4	0	5	
	3	+	-	75	1	7.9	1	10	
3	1	-	+	25	3	2	0	2	
	2	-	+	25	3	1.85	0	2	
	3	-	+	25	3	0	0	0	
4	1	+	+	75	3	1.1	0	0	
	2	+	+	75	3	0.5	0	4	
	3	+	+	75	3	10.5	0	2	
5	1	0	0	50	2	17.7	0	2	
	2	0	0	50	2	13.5	0	2	
	3	0	0	50	2	9.4	1	1	
6	1	0	0	50	2	3.7	0	3	
	2	0	0	50	2	6.6	0	1	
	3	0	0	50	2	6.4	1	9	
7	1	0	0	50	2	20.7	1	2	
	2	0	0	50	2	7.6	0	4	
	3	0	0	50	2	15.2	0	1	

Cuadro 8. Valores P obtenidos en el ANOVA de altura, número de hojas y número de raíces de *B. purpurea* después de 3 meses de conservación en los tratamientos planteados para el crecimiento mínimo *in vitro*.

Fuente	Valor P		
	Δ Altura (mm)	Δ Número de hojas	Δ Número de raíces
MS	0.4233	0.5209	0.2931
	0.6004	0.5209	0.0894
Sacarosa			
MS*Sacarosa	0.9755	0.5209	0.5540

Resultados similares a lo anterior (Cuadro 9) fueron obtenidos a los 4 meses de conservación. Los valores P obtenidos en el ANOVA indican que no hay diferencia significativa ($P>0.05$) entre los tratamientos debida a los efectos de la disminución de la fuerza iónica de sales MS y sacarosa en el medio de cultivo, ni efecto en la interacción sales MS con sacarosa, en ninguna de las variables evaluadas (Cuadro 10).

Cuadro 9. Incremento (Δ) de altura (mm), número de hojas y número de raíces de brotes de *B. purpurea* a los 4 meses de conservación *in vitro* en los diferentes tratamientos de crecimiento mínimo.

Tratamiento	Replica	Factores				Δ Mes 4		
		Codificado		Real		mm	Número	Número
		X ₁	X ₂	MS	Sacarosa	Altura	Hojas	Raíces
1	1	-	-	25	1	5.5	0	0
	2	-	-	25	1	3	0	5
	3	-	-	25	1	1.5	0	1
2	1	+	-	75	1	0.5	0	2
	2	+	-	75	1	1.75	0	0
	3	+	-	75	1	2.5	0	0
3	1	-	+	25	3	3	0	2
	2	-	+	25	3	1.25	0	0
	3	-	+	25	3	0	0	1
4	1	+	+	75	3	1.5	1	1
	2	+	+	75	3	0	0	2
	3	+	+	75	3	5.5	0	2
5	1	0	0	50	2	1	0	1
	2	0	0	50	2	0.5	0	0
	3	0	0	50	2	1	0	1
6	1	0	0	50	2	0.5	0	2
	2	0	0	50	2	9.5	0	1
	3	0	0	50	2	1	0	1
7	1	0	0	50	2	1.9	0	1
	2	0	0	50	2	3.5	0	1
	3	0	0	50	2	5	0	1

Cuadro 10. Valores P obtenidos en el ANOVA de altura, número de hojas y número de raíces de *B. purpurea* después de 4 meses de conservación en los tratamientos planteados para el crecimiento mínimo *in vitro*.

Fuente	Valor P		
	Δ Altura (mm)	Δ Número de hojas	Δ Número de raíces
MS	0.7835	0.1718	0.6276
Sacarosa	0.7009	0.1718	1.0000
MS*Sacarosa	0.3849	0.1718	0.1518

Debido a que los resultados indican que la disminución de la fuerza iónica de sales MS y de la sacarosa en el medio de conservación no tiene un efecto significativo sobre dichas variables, la selección de los mejores tratamientos de crecimiento mínimo fue realizada únicamente en base al número de brotes formados durante la conservación. Si bien estas variables no facilitaron la selección entre los diferentes tratamientos, el registro y análisis de dichos datos es de utilidad ya que no se encuentran estudios de este tipo en la literatura y es necesario investigar precisamente los efectos que pudieran tener dichos factores en el desarrollo y crecimiento de *B. purpurea* y así, estos resultados pueden ser considerados en la planificación de estrategias de conservación *in vitro* posteriores.

5.1.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS PLANTEADOS PARA EL CRECIMIENTO MÍNIMO *IN VITRO* EN LA FORMACIÓN DE BROTES DE *B. purpurea*

La formación de nuevos brotes en los cultivos de crecimiento mínimo fue observada y contabilizada desde el primer mes de conservación (Cuadro 11). Sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa sobre el número de brotes entre los distintos tratamientos, por efecto de la disminución de la fuerza iónica de sales MS y de la sacarosa, ni de la interacción entre ambos factores, durante los primeros 3 meses de conservación ($P > 0.05$) (Cuadro 12). A los 4 y 5 meses de conservación solo el factor fuerza iónica de las sales MS tuvo un efecto significativo ($P > 0.05$) (Cuadro 12) en el número de brotes formados durante la conservación, siendo el tratamiento 2 con 75% MS más 1% Sacarosa el que presentó un menor número de brotes.

Cuadro 11. Número de brotes de *B. purpurea* formados en los diferentes tratamientos planteados para el crecimiento mínimo durante la conservación *in vitro*.

Tratamiento	Replica	Factores				Número brotes					
		Codificado		MS	Real	Meses de conservación					
		X ₁	X ₂			Sacarosa	1	2	3	4	5
1	1	-	-	25	1	2	3	8	8	6	6
	2	-	-	25	1	0	0	0	1	3	3
	3	-	-	25	1	0	1	2	4	4	6
	4	-	-	25	1	2	5	9	15	18	18
	5	-	-	25	1	0	0	2	3	5	5
	6	-	-	25	1	5	7	7	11	11	11
2	1	+	-	75	1	0	1	2	2	1	1
	2	+	-	75	1	0	1	2	3	3	3
	3	+	-	75	1	0	0	1	1	1	2
	4	+	-	75	1	4	8	7	7	7	7
	5	+	-	75	1	1	4	5	6	3	3
	6	+	-	75	1	1	1	4	6	6	7
3	1	-	+	25	3	0	3	7	11	16	21
	2	-	+	25	3	1	1	3	7	9	10
	3	-	+	25	3	1	3	6	12	10	22
	4	-	+	25	3	3	4	6	8	15	17
	5	-	+	25	3	0	0	0	0	13	14
	6	-	+	25	3	0	0	5	12	14	25
4	1	+	+	75	3	1	3	3	3	3	3
	2	+	+	75	3	3	5	10	14	14	16
	3	+	+	75	3	1	3	3	3	3	5
	4	+	+	75	3	0	2	2	2	3	4
	5	+	+	75	3	0	0	0	0	0	0
	6	+	+	75	3	1	2	3	4	4	5
5	1	0	0	50	2	2	2	4	4	4	6
	2	0	0	50	2	1	1	1	1	1	3
	3	0	0	50	2	3	4	4	4	4	4
	4	0	0	50	2	0	1	2	2	3	3
	5	0	0	50	2	0	2	3	6	6	6
	6	0	0	50	2	2	5	2	4	4	6
6	1	0	0	50	2	0	1	2	3	3	3
	2	0	0	50	2	0	0	1	1	1	7
	3	0	0	50	2	0	0	1	1	1	1
	4	0	0	50	2	0	0	3	3	3	4
	5	0	0	50	2	3	5	11	11	11	14
	6	0	0	50	2	0	0	0	2	3	3
7	1	0	0	50	2	0	0	0	0	1	2
	2	0	0	50	2	0	1	1	3	4	5
	3	0	0	50	2	1	1	1	1	1	1
	4	0	0	50	2	0	0	1	1	2	2
	5	0	0	50	2	1	2	2	2	2	3
	6	0	0	50	2	2	3	5	4	4	4

Cuadro 12. Valores P obtenidos en el ANOVA de número de brotes de *B. purpurea* formados en la conservación en crecimiento mínimo *in vitro*.

Fuente	Valor P				
	Número de brotes				
Mes de conservación	1	2	3	4	5
MS	0.7489	0.7684	0.3420	0.0379	0.0003
Sacarosa	0.5230	0.6240	0.9413	0.6381	0.0637
MS* Sacarosa	0.5230	0.6240	0.9413	0.7143	0.2098

Después de 6 meses de conservación *in vitro* (Fig. 6) el ANOVA (Cuadro 13) indicó diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos por efecto de la disminución de la fuerza iónica de sales MS, de la sacarosa y de la interacción sales MS y sacarosa ($P < 0.05$). Es importante resaltar que al final de este periodo en los cultivos se apreciaba el marchitamiento de la mayoría de las hojas y la formación de un gran número de raíces que se notaban más alargadas de lo normal, sin embargo éstas no habían perdido su vigor.

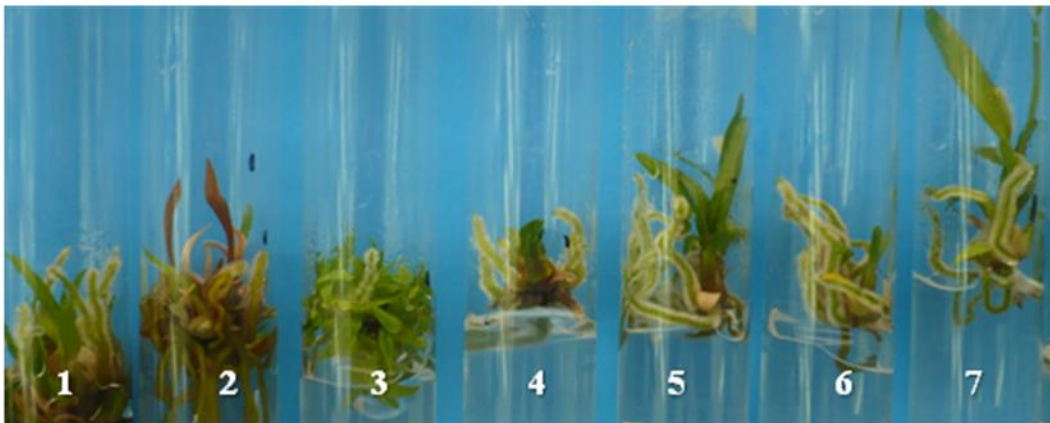


Figura 6. Cultivo *in vitro* de brotes *B. purpurea* después de 6 meses de conservación en los diferentes tratamientos de crecimiento mínimo: 1 (25% MS, 1% sacarosa), 2 (75% MS, 1% sacarosa), 3 (25% MS, 3% sacarosa), 4 (75% MS, 1% sacarosa), 5-7 (50% MS, 2% sacarosa).

Cuadro 13. ANOVA de número de brotes de *B. purpurea* después de 6 meses de conservación en crecimiento mínimo *in vitro*.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Radio F	Valor P
MS	433.5	1	433.5	19.11	0.0001
Sacarosa	204.167	1	204.167	0.00	0.0051
MS*Sacarosa	104.167	1	104.167	4.59	0.0396
Bloques	112.214	5	22.4429	0.99	0.4393
Error total	748.738	33	22.689		
Total	1602.79	41			

En el Grafico de Pareto (Fig. 7) podemos observar que el efecto de la disminución de la fuerza iónica de las sales MS sobre el número de brotes formados durante la conservación fue mayor que el efecto de la concentración de sacarosa y que el efecto de la interacción entre ambos factores, sin embargo los tres factores presentaron un efecto significativo sobre esta respuesta.

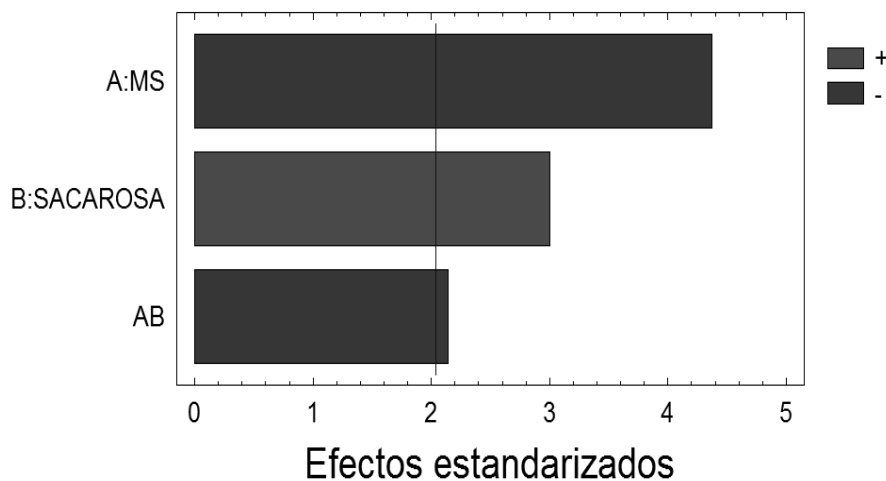


Figura 7. Grafico de Pareto de los efectos de la disminución de la fuerza iónica de sales MS y de la concentración de la sacarosa sobre el número de brotes después de 6 meses de conservación de *B. purpurea* (Lam.).

En el Grafico de Efectos principales (Fig.8), se observa que la pendiente de la fuerza iónica de las sales MS es más pronunciada que la pendiente de la concentración de sacarosa lo que reafirma nuevamente el mayor efecto de dicho factor. El efecto de la fuerza iónica de las sales MS es negativo, esto sugiere que al incrementar la fuerza iónica de las sales MS del nivel bajo (25%) al nivel alto (75%) en el medio de cultivo se reduce la formación de brotes. Por el contrario, el efecto de la concentración de sacarosa es positivo; esto indica que al incrementar la cantidad de sacarosa en el medio de cultivo se incrementa la formación de brotes.

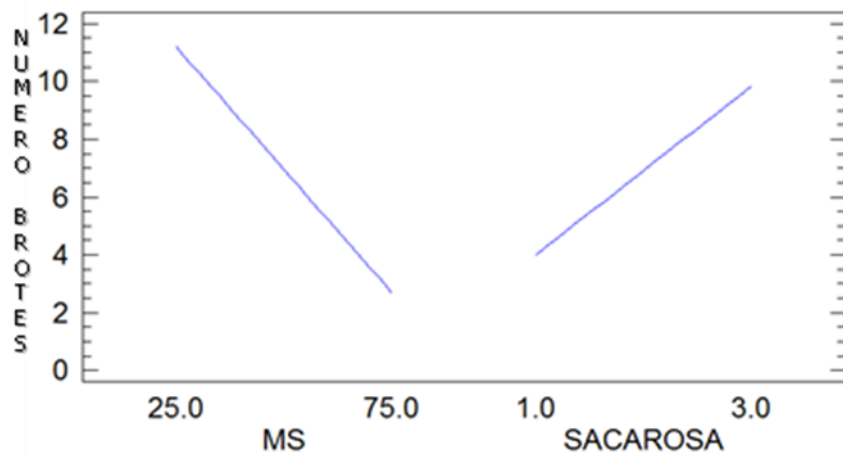


Figura 8. Grafico de los efectos principales: disminución de la fuerza iónica de sales MS y de la concentración de la sacarosa, sobre el número de brotes después de 6 meses de conservación de *B. purpurea* (Lam.).

En el Grafico de Interacción (Fig. 9) podemos observar que las pendientes no son paralelas lo que indica que la interacción entre la fuerza iónica de las sales MS y la concentración de sacarosa es significativa, sin embargo el efecto de la interacción parece ser pequeño en comparación con los 2 efectos principales. En la interacción de los factores, se observa también que el efecto de las sales MS es muy pequeño cuando la fuerza iónica esta en el nivel alto (75%) y muy grande cuando la fuerza iónica esta en el nivel bajo (25%), es decir, a una fuerza iónica de 75% la diferencia en el número de brotes obtenidos con 1% y 3% de sacarosa es pequeña, mientras que a una fuerza iónica de 25% de las sales MS, la diferencia en el número de brotes que se obtiene con una concentración de 1% de sacarosa es mucho mayor al obtenido con 3% de sacarosa.

En general, el menor número de brotes se obtiene en el tratamiento 2 cuya composición de medio de cultivo consta de 75% MS, 1% sacarosa (Fig. 10) y en el tratamiento 4 con 75% MS, 3% sacarosa. El material vegetal recuperado después de la regeneración *in vitro* de los brotes provenientes del tratamiento 2 y 4 fue analizado para determinar su nivel de estabilidad genética.

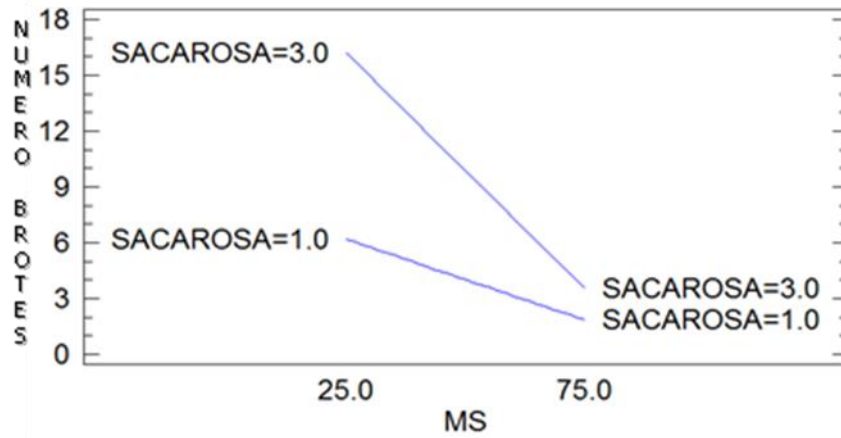


Figura 9. Grafico de interacción entre la fuerza iónica de las sales MS y la concentración de sacarosa sobre el número de brotes después de 6 meses de conservación de *B. purpurea* (Lam.)



Figura10. Cultivo *in vitro* de brotes *B. purpurea* después de 6 meses de conservación en crecimiento mínimo en medio MS 75% y sacarosa 1%.

Este estudio representa el primer reporte de la conservación *in vitro* de *B. purpurea*. La disminución de la fuerza iónica y de la concentración de la fuente de carbono del medio de cultivo fue efectiva para limitar el crecimiento en esta especie. Al disminuir la fuerza iónica de sales MS al 75% y la concentración de sacarosa al 1% se logró el crecimiento más limitado expresado en número de brotes formados durante la conservación. Los resultados obtenidos coinciden con varios autores, Roca *et al.* (1994) reportaron una reducción en el crecimiento *in vitro* de plantas de yuca disminuyendo proporcionalmente el contenido de nitrógeno total del medio de cultivo. García *et al.* (2004) conservaron, con calidad y durante seis meses sin realizar subcultivos, plantas *in vitro* de caña de azúcar, con la reducción de las sales MS al 25 y 50% de su fuerza iónica. Martin y Pradeep (2003) reportaron un protocolo para la conservación *in vitro* de la orquídea *Ipsea malabárica* mediante el uso del medio de cultivo MS a la mitad de fuerza iónica, sin RCV ni azúcar, logrando mantener los cultivos en almacenamiento hasta 24 meses, los brotes crecieron muy lentamente y con poca frecuencia desarrollaron otros brotes. Tyagi *et al.* (2009) reportaron el crecimiento mínimo en *Elletaria cardamomun* en medio MS al 50% suplementado con 5 μ M de BAP. En comparación con otros protocolos el trabajo realizado en *Bletia purpurea* tiene la ventaja de que no se requiere el uso de RCV, ni de retardantes del crecimiento específicos, la modificación de la concentración del medio basal fue suficiente.

5.2. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REGENERACIÓN *IN VITRO* DE *B. purpurea* DESPUÉS DE 6 MESES DE CONSERVACIÓN EN MEDIO DE CRECIMIENTO MÍNIMO.

El porcentaje de regeneración de los cultivos de *B. purpurea* conservados por 6 meses en condiciones de crecimiento mínimo fue de 100% a las 6 semanas después de la resiembra. Los brotes recuperados de los mejores tratamientos seleccionados para el análisis de la estabilidad genética del tratamiento 2 con 75% MS y 1% sacarosa y del tratamiento 4 con 75% MS y 3% sacarosa, no perdieron la capacidad de regeneración y multiplicaron normalmente, sin cambios morfológicos aparentes (Fig. 11). Resultados similares fueron reportados por Negash *et al.* (2001) que después de mantener por 6 meses los cultivos de enset lograron multiplicar exitosamente los brotes recuperados, solo que para la regeneración tuvieron que utilizar BAP, a diferencia de lo aquí reportado para *Bletia purpurea* que no fue necesario el uso de RCV para la regeneración.



Figura 11. Cultivo *in vitro* de brotes *B. purpurea* después de 6 semanas en medio de regeneración.

5.3. ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA DE *B. purpurea* DESPUÉS DE LA CONSERVACIÓN EN CRECIMIENTO MÍNIMO *IN VITRO*

El ADN genómico de brotes de *B. purpurea in vitro* (testigo) se utilizó como templado en la PCR, con los 20 iniciadores disponibles para el análisis genético. En base a los productos amplificados, se identificaron y seleccionaron los oligonucleótidos que amplificaron mayor número de fragmentos, de buena resolución y polimórficos, mismos que fueron OBD 02, OBD 07, OBD 08, y OBD 11, y con los cuales se obtuvieron los perfiles de bandeo para el análisis de la estabilidad genética en los tratamientos de crecimiento mínimo 2: 75% MS, 1% sacarosa (CM2) y 4: 75% MS, 3% sacarosa (CM4).

Mediante la amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD) se generó el perfil de bandeo para cada combinación genotipo-oligonucleótido, observándose que los fragmentos amplificaron nítida y claramente. Un total de 20 bandas monomórficas, en un rango de longitud de 600 a más de 1,000 pares de bases fueron obtenidas utilizando 4 diferentes oligonucleótidos.

Los brotes conservados en condiciones de crecimiento mínimo (CM2 y CM4), no mostraron variaciones en sus patrones electroforéticos cuando fueron comparados con brotes no sometidos a condiciones de conservación (T) (Fig. 12).

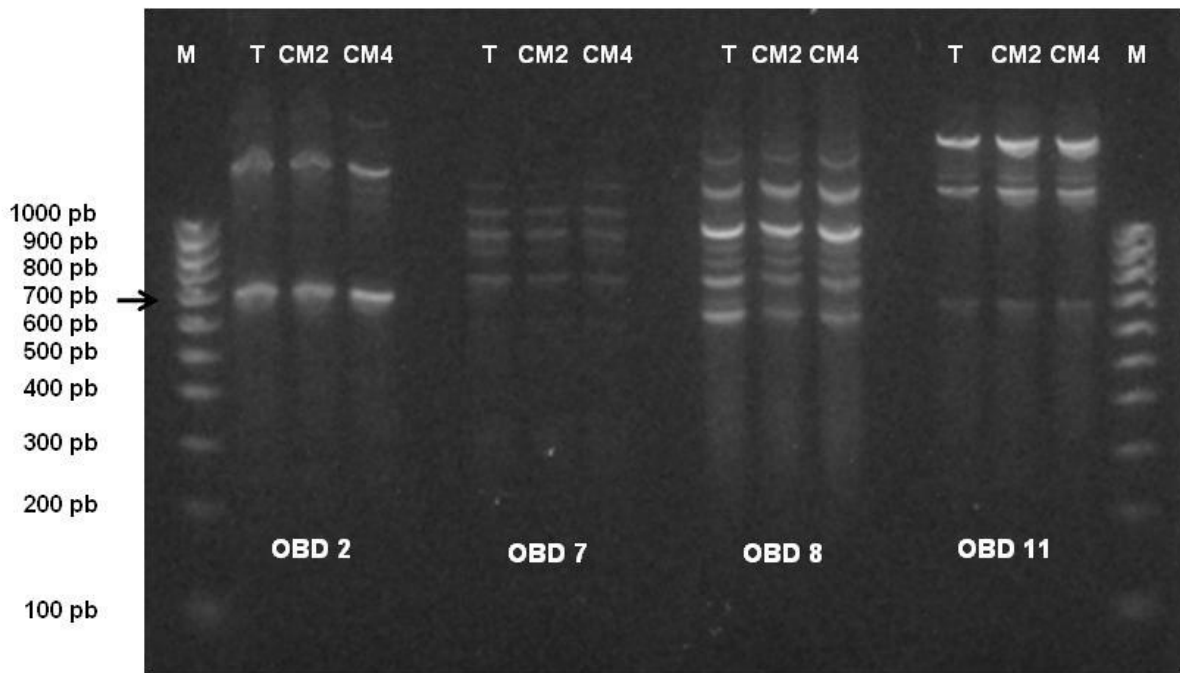


Figura 12. Patrones RAPD de *B. purpurea* generados de brotes *in vitro* no conservados (T) y conservados en crecimiento mínimo 2: 75% MS, 1% sacarosa (CM2) y 4: 75% MS, 3% sacarosa (CM4) con secuencias iniciadoras arbitrarias (OBD 2, OBD 7, OBD 8 y OBD 11). El marcador de peso molecular (M) se indica en pares de bases.

Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Hassan y Bekheet (2008) en fresa después de 15 meses de conservación; en el cual los perfiles de amplificación del material preservado fue comparado con explantes *in vitro* no conservados. En este estudio el análisis de los marcadores RAPD no mostró ninguna variación entre el material preservado y no preservado. Así mismo Bekheet (2007) en su estudio en la conservación *in vitro* de *Globe artichoke* reporta que el análisis RAPD de plántulas provenientes de brotes conservados *in vitro* fueron genéticamente idénticos al testigo (brotes no conservados).

Durante el estudio de conservación *in vitro* de *B. purpurea* se utilizaron brotes completos con el fin de minimizar el riesgo de variación genética, esta estrategia como pudo comprobarse después del análisis genético, minimizó el riesgo de variación genética. De igual forma la estrategia de disminuir la fuerza iónica del medio y la concentración de sacarosa, no indujo variaciones en el germoplasma del material conservado *in vitro*.

En la Fig. 13. Se muestran los pasos del protocolo establecido para la conservación *in vitro* en condiciones de crecimiento mínimo de *Bletia purpurea* (Lam.) y Evaluación de la estabilidad genética.

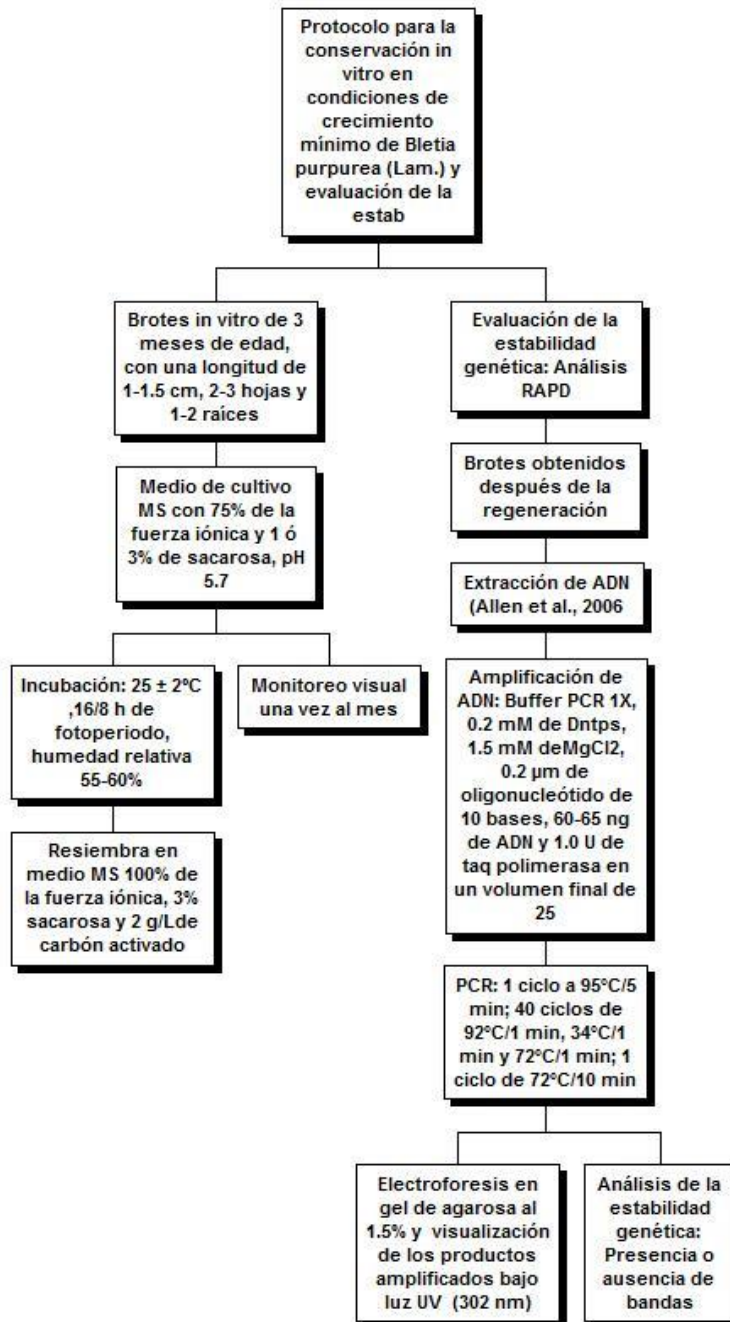


Figura 13. Protocolo establecido para la conservación in vitro en condiciones de crecimiento mínimo de *Bletia purpurea* (Lam.) y Evaluación de la estabilidad genética.

VI. CONCLUSIONES

Se logro establecer un protocolo para mantener el germoplasma de *Bletia purpurea* en cultivo *in vitro* sin tener que realizar resiembras durante 6 meses, en base a la selección de los tratamientos que mostraron menor formación de brotes. Los tratamientos seleccionados para la conservación del germoplasma de *Bletia purpurea* en condiciones de crecimiento mínimo son el tratamiento 2 formulado con MS al 75% más 1% de sacarosa y el tratamiento 4 compuesto por MS al 75% más 3% de Sacarosa.

La estrategia utilizada en la modificación del medio de cultivo permitió la conservación *in vitro* de *B. purpurea* en condiciones de crecimiento mínimo por un periodo de 6 meses con una tasa de sobrevivencia de 100%.

El uso del protocolo establecido para el crecimiento mínimo permitirá almacenar el germoplasma de *Bletia purpurea* (Lam.) a un menor costo, contribuyendo así a la conservación de esta especie.

No se logro dar resultados de crecimiento mínimo basado en el parámetro de la altura de la planta en esta especie, debido a que ocurrió un crecimiento prolífico ocasionando que el brote original desapareciera completamente al tercer mes de cultivo para dar lugar a nuevos brotes. Sin embargo, estos resultados pueden tomarse como base para un sistema de micropropagación vía organogénica.

Los brotes recuperados después de los 6 meses de la conservación en medio de crecimiento mínimo no perdieron la capacidad de regeneración y lograron multiplicarse normalmente sin mostrar variaciones en sus patrones electroforéticos cuando fueron comparados con brotes no sometidos a condiciones de conservación.

El protocolo descrito en este estudio fue efectivo para la conservación *in vitro* en crecimiento mínimo de *B. purpurea* (Lam.) ya que no se presentaron alteraciones genéticas en los tratamientos evaluados mediante marcadores RAPDs.

VII. RECOMENDACIONES

Para investigaciones futuras se recomienda tomar como referencia los resultados aquí reportados para diseñar una metodología que contemple la evaluación de un tratamiento sin fuente de carbono, así como el uso de otros agentes osmóticos como manitol y sorbitol y la extensión del periodo de conservación de *B. purpurea*.

La estrategia utilizada en este estudio puede ser aplicada a otras especies de orquídeas.

Se recomienda emplear el análisis RAPD como una herramienta útil para estudiar la estabilidad genética durante la conservación *in vitro* dentro de la familia Orquidaceae.

La conservación *in vitro* del germoplasma tiene muchas ventajas, pero hay que tener en cuenta que siempre hay riesgos derivados de fallas en el equipo y contaminación de los medios por falta de control, por lo que deberán tomarse las medidas necesarias para que no se dañe el germoplasma.

VIII. BLIBLIOGRAFIA

Ackerman, J. 1995. The orchid flora of Puerto Rico and the Virgin Islands. Mem NY Bot Gard 73:1–203.

Agarwal, M., Shrivastava, N. and Padh, H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. Plant Cell Reports 27: 617-631.

Allen, G., Flores-Vergara, M., Krasnyanski, S., Kumar, S. and Thompson, W. 2006. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide. Nature Protocols. Vol. 1 No. 5.

Al-Zahim, M., Ford-Lloyd, B., and Newburry, H. 1999. Detection of somaclonal variation in garlic (*Alium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. Plant Cell Report 18: 473-477.

Araújo, L., Prabhu, A., Filippi, M., and Chaves, L. 2001. RAPD analysis of blast resistant somaclones from upland rice cultivar IAC 47 for genetic divergence. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 67: 165–172.

Aravanopoulos, F. 2003. Molecular identification of micropropagated plants. Acta Horticulturae 616: 25–47.

Arditti, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. The botanical Review. 33 (1): 1-97.

Ávila, I. & Oyama, K. 2002. Manejo sustentable de *Laelia speciosa* (Orchidaceae). Biodiversitas. 7(43):9-12.

Azofeifa-Delgado, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. Agronomía Mesoamericana 17: 221–242.

Bechtel, H., Cribb, P. & Launert, E. 1981. The manual of cultivated orchid species. The MIT Press. Cambridge. 443 p.

Bekheet, S.A., 2007. *In vitro* preservation of *Globe artichoke* germplasm. Plant Tissue Cult. & Biotech., 17(1): 1-9.

Bellido, O. 2007. Orquídeas. Naturart, S. A. Editado por Blume jardinería. Barcelona. pp 6.

Bertrand, A., Noirot, M. and Charrier, A. 1992. Slow growth *in vitro* conservation of coffee (*Coffea* spp.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31: 105-110.

Bhat, S. and Chandel, R. 1993. *In vitro* conservation of *Musa* germplasm: effects of manitol and temperature on growth and storage. *Journal of Horticultural Science* 68: 841-845.

Brown, P. 2005. *Wild orchids of Florida*, expanded and updated edition. University Press of Florida, Gainesville, Florida.

Caccavale, A., Lambarri, M. and Fabbri, A. 2005. Cryopreservation of woody plants by axillary bud vitrification: a first approach with poplar. (ISHS) *Acta Horticulturae* 457: Symposium on Plant Biotechnology as a tool for the Exploitation of Mountain Londs.

Campbell, C., Alice, L. and Wright, W. 1999. Comparisons of within-population genetic variation in sexual and agamospermous Amelanchier (Rosaceae) using RAPD markers. *Pl. Syst. Evol.* 215: 157-167.

Dodds, J. 1991. *In Vitro* Methods for Conservation of Plant Genetic Resources. Chapman & Hall, London, 240 pp.

Dutra, D., Johnson, T., Kauth, P., Stewart, S., Kane, M. and Richardson, L. 2008. Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* (2008) 94:11–21.

Engelmann, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm - a review. *Euphytica* 57: 227-243.

Engelmann, F. and Takagi, H. 2000. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. JIRCAS, Tsukuba, Japón/IPGRI, Roma.

Espejo, A., García, J., López, A., Jiménez, R. y Sánchez, L. 2002. Orquídeas del estado de Morelos. *Orquídea (Méx.)* Volumen 16. México, D. F. 332 p.

FAO. 1996. Report on the state of world's plant genetic resources – International Technical Conference on Plant Genetic Resources, Leipzig, Germany, FAO, Roma.

Fay, M. y Clemente, M. 1997. Aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos en la propagación y conservación de especies amenazadas. Monograf. Jard. Bot. Córdoba. 5:43-50.

Fay, M., Bunn, E. and Ramsay M., 1999. *In Vitro* Propagation. En: A Colour Atlas of Plant Propagation and Conservation. Bowes, B.G. (ed.), Manson Publishing, London, pp. 97-107.

Feuser, S., Meler, K., Daquinta, M., Guerra, M. and Nodari, R. 2003. Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 72: 221–227.

Frankel, O. 1995. Genetic perspectives of germplasm conservation. En: Arber WK, Imensee K, Peacock WJ and Starlinger D (eds), Genetic Manipulations: Impact on man and society, pp. 161-170. Cambridge University Press. Cambridge.

García, L., Pérez, J., Rodríguez, M., Pérez, B., Martínez, Y. y Sarría, Z. 2004. Conservación *in vitro* de plantas de caña de azúcar. Biotecnología Vegetal 4(2): 101-105.

García Águila, L., L., De Fera, M. y Acosta, K. 2007. Aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. Biotecnología Vegetal Vol. 7, No. 2: 67-79.

González, E. 2007. Establecimiento de las condiciones de crecimiento mínimo para la conservación *in vitro* de germoplasma de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Tesis. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Yucatán.

Goncalves, S. y Romano, A. 2007. *In vitro* minimum growth for conservation of *Drosophyllum lusitanicum*. Biologia Plantarum 51 (4): 795-798.

Gostimsky, S., Kokaeva, Z. and Konovalov, F. 2005. Studying plant genome variation using molecular markers. Russian Journal of Genetics 41: 378-388.

Graudal, L., Kjaer, E., Thomden, N. and Larsen, A. 1997. Planning national programmes of forest genetic resources. Technical Note N° 48. Danida Forest Seed Centre.

Hágsater, E. & Soto, A. 2001. Orchid conservation in México. Pp. 18-22 in: W.E. Higgins & B.W. Walsh (eds.) Orchid conservation proceedings. Selby Botanical Gardens Press, Sarasota.

Hames, B. and Rickwood, D. 1990. Gel electrophoresis of proteins. Oxford, R.U., Oxford University Press. 383 p.

Hassan, N. and Bekheet, S. 2008. Mid-term Storage and Genetic Stability of Strawberry Tissue Cultures. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 4(5): 505-511.

Hirai, D, Sakai, A. 2003. Simplified cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L) Lam) by optimizing conditions for osmoprotection. Plant Cell Report 21(10): 961-966.

Iriondo, A. 2001. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas (Revisión). Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg. Vol. 16 (1).

Iriondo, J., and Pérez, C. 1999. Propagation from Seeds and Seed Preservation. En: A Colour Atlas of Plant Propagation and Conservation. Bowes, B.G. (ed.), Manson Publishing, London, pp. 46-57.

Isabel, N., Trembley, L., Michaud, M., Tremblay, F. and Bousquet, J. 1993. RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis-derived populations of *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. Theor. Applied Genet., 86: 81-87.

IUCN/SSC Orchid Specialist Group. 1996. Orchids – Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN, Gland Switzerland and Cambridge, UK. Quintanar, A. 1961. Las plantas ornamentales, SAG. pp. 113- 117.

Jaligot, E., Rival, A., Beulé, T., Dussert, S. and Verdeil, J. 2000. Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis. Plant Cell Reports 19: 684–690.

Kate-ngam Sureeporn and Lakote Padcharee. 2008. A comparative study of different RAPD-PCR protocols for genetic diversity analysis of *Doritis* germplasm. Agricultural Sci. J. 39(3) (Suppl.): 203-206.

Khosravi, A. R., Kadir, M. A., Kadzemin, S. B., Zaman, F. Q. and De Silva, A. E. 2009. RAPD analysis of colchicine induced variation of the *Dendrobium* Serdang beauty. African Journal of Biotechnology Vol. 8 (8), pp. 1455-1465

Lim, S., Chye-Peng, P., Yew-Hwa, L. and Chong-Jin, G. 1999. RAPD Analysis of Some Species in the Genus *Vanda* (Orchidaceae). *Annals of Botany* 83: 193-196

Lowe, A., Gillies, A., Wilson, J. and Dawson, I. 2000. Conservation genetics of bush mango from central/west Africa: implications from random amplified DNA analysis. *Molecular Ecology* 9: 831-841.

Lynch, P. 1999. Tissue Culture Techniques in *In Vitro* Plant Conservation. En: Plant Conservation Biotechnology. Benson, E. (ed.). Taylor & Francis, London, pp. 41-62.

Martín, C. 1993. Micropropagación y conservación *in vitro* de seis especies del género *Limonoium* endémicas de la Península Ibérica. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid, Madrid.

Martín, C., Uberhuaga, E. and Pérez, C. 2002. Application of RAPD markers in the characterization of *Chrysanthemum* varieties and the assessment of somaclonal variation. *Euphytica* 127: 247–253.

Martin, K. and Pradeep, A. 2003. Simple strategy for the *in vitro* conservation of *Ipea malabarica* an endemic and endangered orchid of the Western Ghats of Kerala, India. *Plant Cell tissue and organ culture*. 74 (2): 197-200.

McKendrick, S. 2000. Manual para la germinación *in vitro* de orquídeas. Copyright Ceiba Foundation for Tropical Conservation. En línea: [www.ceiba.org/documents/CFTCpropman\(SP\).pdf](http://www.ceiba.org/documents/CFTCpropman(SP).pdf).

McNeely, J., Miller, K., Reid, W., Mittermeier, R. & Werner, T. 1990. Conserving the world's biological diversity. IUCN, WRI, CI, WWF-US, World Bank. 193 pp.

Melo Ferreira W., Barbante Kerbauy G., and Pimentel Costa A. 2006. Micropropagation and genetic stability of a *Dendrobium* hybrid (Orchidaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 42:568–571.

Mendoza-Herrera, A. y Simpson, J . 1996. Uso de marcadores moleculares en la agronomía. Avances y Perspectivas. CINVESTAV, Unidad de Irapuato. 16: 53-57.

Mitchell, R. 1989. Growing hardy orchids from seeds at Kew. *Plantsman* . 11(3): 152 - 169.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Plant Physiology* 15: 473 – 497.

Nebauer, S., Castillo-Agudo, L. and Segura, J. 1999. RAPD variation whitening and among natural populations of outcrossing willow leaved foxglove (*Digitalis obscura* L.) Theor. Appl. Genet. 98:985-994.

Negash, A., Kresh F., Schaart, J., and Visser B. 2001. In vitro conservation of enset under slow-growth conditions.

Nodarse, O., Santana, I., Cornides, M., Figueredo, Y., Héctor, E. y Rodríguez, R. 1998. Comparación de probaciones de caña de azúcar conservadas *in vitro* e *in situ*. Libro de resúmenes. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Palacio de las Convenciones. Ciudad de la Habana.

Noro, Y., Takano-Shimizu, T., Syono, S., Kishima, Y. and Sano, Y. 2007. Genetic variations in rice *in vitro* cultures at the *EPSPs-PS20* region. Theoretical and Applied Genetics 114: 705–711.

Nunome, T., Ishiguro, K., Yoshida, T. and Hirai, M. 2001. Mapping of fruit shape and color development traits in eggplant (*Solanum melogena* L.) based on RAPD and AFLP markers. Breeding Science 51: 19-26.

Ortiz, R. 2000. Conservación de células, tejidos y órganos vegetales a bajas temperaturas: Crioconservación [en línea] 2000. Disponible en:<http://www.hannover2000.net/expo2000hannove/es/tecnologia/proyectos/crioconservacion/largo.htm>.

Palestina, R. and Sosa, V. 2002. Morphological variation in populations of *Bletia purpurea* (Orchidaceae) and description of the new species *B. riparia*. Brittonia 54:99–111.

Palombi, M. and Damiano, C. 2002. Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev). Plant Cell Reports 20: 1061–1066.

Panis, B., Totte, N., Van Nimmen, K., Withers, L. and Swennen, R. 1996. Cryopreservation of banana (*Musa* ssp.) meristem cultures after preculture on sucrose. Plant Science 121: 95-106.

Parab, G. V. and Krishnan, S. 2008. Assessment of genetic variation among populations of *Rhynchostylis retusa*, an epiphytic orchid from Goa, India using ISSR and RAPD markers. Indian Journal of Biotechnology Vol 7: 313-319.

Pardo, A., Michelangeli, C., Ramis, C., Mogollón, N. y Silva, C. 2008. Evaluación de la estabilidad genética mediante RAPD, en brotes de *Billbergia rosea* Hortus Ex Beer, conservados *in vitro*. *Bioagro* 20(2): 97-104.

Patzak, J. 2003. Assessment of somaclonal variability in hop (*Humulus lupulus* L.) *in vitro* meristem cultures and clones by molecular methods. *Euphytica* 131: 343–350.

Pence, V. 1999. The Application of Biotechnology for the Conservation of Endangered Plants. En: *Plant Conservation Biotechnology*. Benson, E. (ed.). Taylor & Francis, London, pp. 227-250.

Phillips, R., Kaeppler, S. and Olhoft, P. 1994. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proceedings National Academy Science* 91, 5222-5226.

Picca, A., Helguera, M., Salomón, N. y Carrera, A. 2004. Marcadores moleculares. In Echenique, V. Rubinstein, C. Mroginski, L. eds. *Biología y mejoramiento vegetal*. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Argentina, Ediciones INTA. p. 61-68.

Prado, MJ; Gonzalez, MV; Romo, S; Herrera, MT. 2007. Adventitious plant regeneration on leaf explants from adult male kiwifruit and AFLP analysis of genetic variation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 88: 1–10.

Rao, K. 2004. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology* 3(2): 136-145.

Rayas, A., Mederos V., García, M., López, J., Cabrera, M., Ventura, J., Martínez, M., Gutiérrez, V., Álvarez, M. y Bauta, M. 2002. Estudio de medios de cultivo para la conservación *in vitro* de la yuca. *Biología Vegetal* 2(4): 249-251.

Roca, W., Escobar, R. and Mafla, G. 1994. Conservación de germoplasma de yuca *in vitro*. Principios y técnicas. CIAT, Cali, Colombia.

Rodríguez, L., González, R., Fajardo E., Sánchez E., Hernández, J., Castañeira, M., De la Cruz, E. y González, J. 2005. Producción y recuperación de orquídeas silvestres cubanas. [En línea]. Cuba. ISBN 959-250-156-4. *Disponible en: www.dama.gov.com*.

Sahijram, L, Soneyi, J. and Bollamma, K. 2003. Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 39: 551–556.

Salazar R.V.M. 2003. Micropropagación de *Mormodes tuxtlensis* Salazar, *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex. Y *Lycaste skinneri* (Batem. Ex. Lind.) lind. (Orchidaceae) a partir de protocormos. Tesis de licenciatura. Escuela de Biología. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México. 106 p.

Salazar, R. y Mata, R. 2003. Micropropagación y conservación de orquídeas mexicanas en el Jardín Botánico Clavijero. *Lankesteriana* 7: 151-153.

Sánchez, M., Sarmiento, M. y Andrews, J. 1998. Orquídeas silvestres de Campeche con alto potencial económico. Folleto técnico. SAGDR-INIFAB.

Sánchez, M., Sarmiento, M. y Andrews, J. 2000. Algunas Orquídeas abundantes en el Estado de Campeche. Folleto técnico SAGDR-INIFAB.

Sánchez, M., Sarmiento, M. y Andrews, J. 2002. Orquídeas de Campeche. Primera edición. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campeche, México.

Sánchez-Chiang, N. y Jiménez, V. 2009. Técnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales. *Agronomía Mesoamericana* 20(1): 135-151.

Sánchez-Teyer, L., Quiróz-Figueroa, F., Loyola-Vargas, V. and Infante, D. 2003. Culture-induced variation in plants of *Coffea arabica* cv. Caturra rojo, regenerated by direct and indirect somatic embryogenesis. *Molecular Biotechnology* 23: 107–115.

Sarasan, V., Cripps, R., Ramsay, M., Atherton, C., MCMichen, M., Prendergast, G., and Rowntree, J. 2006. Conservation in vitro of threatened plants – progress in the past decade. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 42:206–214.

Scowcroft, W. 1985. Somaclonal Variation: the Myth of Clonal Uniformity. En: *Genetic Flux in Plants*. Hohn, B., Dennis, E.S. (eds.). Springer-Verlag, Wien, pp. 217-245.

SEMARNAT. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059- ECOL-2001. 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.

Shibli, R., Shatnawi, M., Subaih, W. and Ajlouni, M. 2006. *In vitro* conservation and cryoconservation of plant genetic resources: A review. *World Journal of Agricultural Sciences* 2(4): 372-382.

Singh, M., Sherpa, A., Hallan, V., Zaidi, A. 2007. A potyvirus in *Cymbidium* spp. in northern India. *Austr. Plant Dis. Notes* 2: 11-13.

Sosa, V. & Platas, T. 1998. Extinction and persistence of rare orchids in Veracruz, México. *Conservation Biology*. 12(2): 451-455.

Sosa, V. and Díaz-Dumas, M. 1997. Orchids from the Greater Antilles I: a new species of *Bletia*. *Brittonia* 49:79-83.

Soto, A. 1994. Listado actualizado de las orquídeas de México. *Orquídea (Méx.)* 11: 233-277.

Staritsky, G. 1980. Growth inhibition and dormancy. En: *Crop genetic resources: The conservation of difficult material. Proceedings of an international workshop.* University of Reading, Reino Unido.

Suksa, P., Kataoka, I., Fujime, Y. and Subhadrabandhu, S. 1997. Effect of temperature, growth retardants and osmotic potential on growth of papaya shoots conserved *in vitro*. *Tropical Agriculture* 41 (1): 7-13.

Taylor, P., and Dukin, S. 1993. Development of an *in vitro* culture technique for conservation of *Saccharum* ssp. Hybrid germplasm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34: 217-222.

Tinoco, J. y Mata, R. 2007. Adquisición de competencia para la micropropagación de *Stanhopea tigrina*, *Laelia anceps*, *Epidendrum veroscriptum* y *Cattleya* x *esbetts* (Orchidaceae). *Lankesteriana* 7(1-2): 404-418. 2007.

Toledo, J. and Golmirzaie, A. 1998. Conservación *in vitro* de *Solanum* spp bajo condiciones de estrés osmótico y ambiental. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú. Libro de Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal REDBIO 98. Junio/1-5. Palacio de Convenciones. Habana. Cuba.

Tomes, D. 1979. A tissue culture procedure for propagation and maintenance of *lotus corniculata* genotypes. *Can J, Bot.*, 57: 137-140.

Tsavkelova, E., Cherdynseva, T., Lobakova, F., Kolomeitseva, G. and Neutrosov, A. 2001. Microbiota of the Orchid Rhizoplane. *Microbiology*, 4: 492-497.

Tyagi, R., Agrawal, A., Mahalakshmi, C., Hussain, Z. and Tyagi, H. 2007. Low-cost media for in vitro conservation of turmeric (*Curcuma longa* L.) and genetic stability assessment using RAPD markers. *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant* 43:51–58.

Tyagi, R. K., Goswami R., Sanayaima R., Singh R., Tandon R. and Anuradha A. 2009. Micropropagation and slow growth conservation of cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton) Rishi K. *In vitro Cell Dev. Biol. –Plant* 45: 721-729.

Uyoh, E., Nkang, A., and Eneobong, E. 2003. Biotechnology, genetic conservation and sustainable use of bioresources. *African Journal of Biotechnology* Vol. 2 (12), pp. 704-709.

Varshney, A., Lakshmikumaran, M., Srivastava, P. and Dhawan, V. 2001. Establishment of genetic fidelity of *in vitro* raised *Lilium* bulblets through RAPD markers. *In Vitro Cellular and Development Biology* 37 (2): 227-231.

Wang, Z. and Deng, X. 2004. Cryopreservation of shoot tips of citrus using vitrification: effect of reduced form of glutathione. *Cryo-Letters* (25): 51-58.

Williams, JGK; Kubelik, AR; Livak, KJ; Rafalski, JA; Tingey, SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.

Wong K. C. and Sun M. 1999. Reproductive biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 86(10): 1406–1413.

Xena de Enrech, N. 2000. Una década de aplicación del método RAPD: alcances y límites en el estudio de relaciones genéticas en plantas. *Acta Científica Venezolana*, 51: 197–206.

