

Medio de cultivo y sustitutos del agar en el crecimiento *in vitro* de orquídeas*

Culture medium and agar substitutes for *in vitro* growth of orchids

Luis Antonio Flores-Hernández¹, Alejandrina Robledo-Paz^{1§} y María Josefina Jimarez-Montiel¹

¹Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5. Montecillo, Texcoco, Estado de México. CP. 56230. Tel. (595) 20200, ext. 1581. (floresh.luis@colpos.mx; morisonia_77@hotmail.com). [§]Autora para correspondencia: arobledo@colpos.mx.

Resumen

El cultivo *in vitro* es una técnica que ha permitido la propagación de distintas especies de orquídeas, pero el lento crecimiento de este grupo de plantas, así como el costo de las sales minerales y del agente gelificante (agar) empleados en los medios de cultivo, pueden limitar su aplicación. El objetivo del presente trabajo, fue conocer el efecto de la composición del medio de cultivo y el uso de sustratos como sustitutos del agar en el crecimiento *in vitro* de *Laelia anceps* Lindl. y *Epidendrum* sp. Brotes adventicios de ambas especies se cultivaron *in vitro* en distintas mezclas de sustratos (perlita, tezontle y fibra de coco) y agar con diferentes concentraciones de las sales basales de Murashige y Skoog (50 y 100%) y ácido giberélico (AG₃) (0 y 1 mg L⁻¹) para evaluar su longitud, número de hojas, número de raíces y peso fresco en un diseño experimental con tres factores y 15 repeticiones, cada repetición consistió en un frasco con 5 brotes adventicios. El comportamiento *in vitro*, estuvo en función del genotipo; *L. anceps* Lindl. respondió mejor que *Epidendrum* sp. Los brotes crecidos sobre perlita-tezontle o fibra de coco-tezontle, y medios con sales al 50% y AG₃ no mostraron diferencias significativas en cuanto a su longitud, número de hojas, número de raíces y peso fresco,

Abstract

The *in vitro* culture is a technique that has allowed the spread of different species of orchids, but the slow growth of this group of plants, and the cost of the minerals and the gelling agent (agar) used in the culture media, can limit its application. The aim of this research was to understand the effect of the composition of the culture medium and the use of substrates as agar substitutes for *in vitro* growth of *Laelia anceps* Lindl. And *Epidendrum* sp. Adventitious buds of both species were cultured *in vitro* in different substrates mixtures (perlite, volcanic rock and coir) and agar with different concentrations of Murashige and Skoog basal salts (50 and 100%) and gibberellic acid (AG₃) (0 and 1 mg L⁻¹) to evaluate its length, number of leaves, number of roots and fresh weight in an experimental design with three factors and 15 repetitions, each repetition consisted in a flask with 5 adventitious shoots. The *in vitro* behavior was based on the genotype *L. anceps* Lindl. that responded better than *Epidendrum* sp. Outbreaks grown on perlite-volcanic rock or coir-volcanic rock, and mediums with 50% salts and AG₃ showed no significant difference in terms of length, number of leaves, number of roots and fresh weight, with respect to those grown in agar, 100% salts without

* Recibido: marzo de 2017
Aceptado: junio de 2017

con respecto a aquellos que lo hicieron en agar, sales al 100% y sin AG₃. Los medios de cultivo con sales diluidas sin AG₃ y sustratos como sustitutos del agar, permitieron el crecimiento *in vitro* de las plantas de *L. anceps* Lindl. y *Epidendrum* sp. con una reducción significativa del 60% de los costos.

Palabras clave: *Laelia anceps* Lindl., *Epidendrum* sp., ácido giberélico, cultivo *in vitro*, medio de cultivo, sustratos.

Introducción

México tiene una gran diversidad en especies animales y vegetales, cuidar y preservar tal diversidad es muy importante. Al respecto, México alberga una notable riqueza de orquídeas, la cual ha sido registrada en 1 260 especies y 170 géneros (Soto y Salazar, 2004; Hágsater *et al.*, 2005). De éstas: 181 se incluyen en alguna categoría de riesgo en la norma oficial vigente NOM-059-ECOL-2001 (Diario Oficial de la Federación, 2002), 72 son endémicas, 58 están en la categoría de amenazadas, 107 requieren protección especial, 15 están en peligro de extinción y una especie ya está extinta en la naturaleza (*Laelia gouldiana* Rchb. F.) (Diario Oficial de la Federación, 2002).

Laelia anceps Lindl. y *Epidendrum* sp. son dos especies de orquídeas que debido a sus flores llamativas han sido sometidas a una alta presión de colecta. Esta presión, aunada a la destrucción de su hábitat, ha provocado la disminución acelerada de sus poblaciones (Halbinger y Soto, 1997; Romero-Tirado *et al.*, 2007).

Con respecto a su reproducción, la germinación en las orquídeas representa una de las mayores limitantes para su supervivencia, ya que el endospermo está reducido en algunas especies, mientras que en otras se encuentra ausente, por lo que para asegurar su germinación es necesario que las semillas se asocien con hongos micorrízicos que les provean de nutrimentos (Téllez, 2011).

El cultivo *in vitro* es una técnica que facilita la germinación y propagación de prácticamente cualquier orquídea, ya que se lleva a cabo en condiciones de asepsia, en presencia de una fuente de nutrimentos y condiciones físicas controladas, lo que potencializa su capacidad de reproducción y crecimiento (Zettler *et al.*, 2001; Salazar *et al.*, 2013). No obstante, el costo de los materiales utilizados en la elaboración de

AG₃. The culture médium with diluted with salts without AG₃ and substrates as substitutes for agar, allowed the *in vitro* growth of *L. plants anceps* Lindl. And *Epidendrum* sp. plants with a significant 60% costs reduction.

Keywords: *Laelia anceps* Lindl, *Epidendrum* sp., culture medium substrates, gibberellic acid, *in vitro* culture.

Introduction

México has a great diversity in animal and vegetal species, to take care and to preserve such diversity is very important. In this regard, México is home to a remarkable wealth of orchids, which has been recorded in 1 260 species and 170 genera (Soto and Salazar, 2004; Hágsater *et al.*, 2005). Of these, 181 are included in some risk category in the official norm in force NOM-059-ECOL-2001 (Diario Oficial de la Federación, 2002), 72 are endemic, 58 are in the threatened category, 107 require special protection, 15 are endangered and one species is already extinct in the wild (*Laelia gouldiana* Rchb. F.) (Diario Oficial de la Federación, 2002).

Laelia anceps Lindl. And *Epidendrum* sp. are two orchids species that due to their striking flowers have been subjected to a high collection pressure. This pressure, coupled with habitat destruction has led to the rapid decline in their populations (Halbinger and Soto, 1997; Romero-Tirado *et al.*, 2007).

With respect to its reproduction, germination in orchids represents one of the major limitations to its survival, since the endosperm is reduced in some species, while in others it is absent, so to ensure its germination it is necessary that the seeds are associated with mycorrhizal fungi that provide them with nutrients (Téllez, 2011).

The *in vitro* culture is a technique which facilitates the germination and propagation of virtually any orchid, as it is done aseptically, in the presence of a controlled source of nutrients and physical conditions, which potentiates its reproduction and growth ability (Zettler *et al.*, 2001; Salazar *et al.*, 2013). However, the cost of the materials used in the preparation of the culture media is high, especially the gelling agent (agar or phytigel) which can represent up to 70% of the cost of the plants. In addition, the agar may reduce the oxygen concentration and disable the nutrient diffusion in the medium (Fujiwara *et al.*, 1993; Ichimura and Oda, 1998).

los medios de cultivo es alto, especialmente del agente gelificante (agar o phytigel) que puede representar hasta 70% del costo de las plantas. Además, el agar puede reducir la concentración de oxígeno e inhabilitar la difusión de nutrimentos del medio (Fujiwara *et al.*, 1993; Ichimura y Oda, 1998).

Por otro lado, para algunas especies (*Laelia halbigiana* Salazar & Soto Arenas, *Agave cocui* Trelease) se ha documentado que la concentración completa de las sales medio de Murashige y Skoog (1962) que comúnmente se utiliza en el cultivo de tejidos, sobrepasa los requerimientos nutrimentales de los tejidos (Raya-Montaña *et al.*, 2011; González *et al.*, 2012). Asimismo, el lento crecimiento de la mayoría de las orquídeas, contribuye al incremento en los costos de producción, al tener que mantener las plantas *in vitro* por más tiempo hasta que alcancen el tamaño que permita transferirlas al invernadero.

La reducción de los costos de producción podría lograrse con el uso de sustratos hidropónicos (perlita, vermiculita, fibra de coco), ya que pueden ser una alternativa para sustituir los agentes gelificantes caros. Al respecto, se tiene evidencia que el utilizar sustratos durante la fase *in vitro* ha permitido el crecimiento de especies como *Limonium latifolium* Lindl., *Ipomoea batatas* L., y *Myrtus communis* L. (Afreen-Zobayed *et al.*, 1999; Afreen-Zobayed *et al.*, 2000; Lucchesini *et al.*, 2006; Xiao y Kozai, 2006).

De la misma manera, incluir fitoreguladores como el ácido giberélico en el medio de cultivo ha tenido un efecto positivo en el alargamiento del vástago y el número de hojas formadas en *Cattleya loddigesii* Lindl., *Manihot esculenta* Crantz, *Cynodon dactylon* Pers. y *Cuscuta chinensis* Lam. (Maheshwari *et al.*, 1980; Bhagwat *et al.*, 1996; Li y Qu, 2002; Ávila y Salgado-Garciglia, 2006; Rodrigues *et al.*, 2009).

Dada la importancia de cuidar y preservar la diversidad de las orquídeas mexicanas y de proponer alternativas para reducir los costos de producción de su propagación *in vitro*, el objetivo del presente trabajo fue conocer el efecto de la composición del medio de cultivo y el uso de sustratos como sustitutos del agar, en el crecimiento *in vitro* de *Laelia anceps* Lindl. y *Epidendrum* sp. partiendo de la hipótesis de que los medios de cultivo diluidos suplementados con ácido giberélico, y los sustratos permitirán el crecimiento *in vitro* de ambas especies.

Furthermore, for some species (*Laelia halbigiana* Salazar & Soto Arenas, *Agave cocui* Trelease) it has been documented that the full concentration of the Murashige and Skoog (1962) medium salts, commonly used in tissue culture, exceeds the tissue nutritional requirements (Raya-Montaña *et al.*, 2011; González *et al.*, 2012). Also, the slow growth of most orchids, contributes to increased production costs, having to keep plants *in vitro* longer until they reach a size that allows to transfer them to the greenhouse.

The reduction of production costs could be achieved with the use of hydroponic substrates (perlite, vermiculite, coir), as they may be an alternative to replace expensive gelling agents. In this regard, there is evidence that the use substrates during *in vitro* phase has allowed growth in species like *Limonium latifolium* Lindl., *Ipomoea batatas* L., and *Myrtus communis* L. (Afreen-Zobayed *et al.*, 1999; Afreen-Zobayed *et al.*, 2000; Lucchesini *et al.*, 2006; Xiao y Kozai, 2006).

Similarly, including phytohormones as gibberellic acid in the culture medium has had a positive effect on stem elongation and the number of formed leaves in *Cattleya loddigesii* Lindl., *Manihot esculenta* Crantz, *Cynodon dactylon* Pers. and *Cuscuta chinensis* Lam. (Maheshwari *et al.*, 1980; Bhagwat *et al.*, 1996; Li and Qu, 2002; Ávila and Salgado-Garciglia, 2006; Rodrigues *et al.*, 2009).

Given the importance of taking care and preserve the diversity of Mexican orchids and to propose alternatives to reduce production costs of it *in vitro* propagation, the objective of this research was to determine the effect of the composition of the culture medium and the use of substrates as substitutes for agar, in the *in vitro* growth of *Laelia anceps* Lindl. and *Epidendrum* sp. Based on the assumption that diluted culture means supplemented with gibberellic acid, and substrates would enable the *in vitro* growth of both species.

Materials and methods

Culture mediums

The culture mediums tested for the growth of adventitious buds of *Laelia anceps* Lindl. and *Epidendrum* sp. of 1.1 ± 0.1 cm, previously regenerated *in vitro*, containing nutrient salts of Murashige and Skoog (MS) 50 and 100%, 30 g L⁻¹ sucrose, 0 and 1 mg L⁻¹ gibberellic acid (AG₃), agar (7 g L⁻¹) or 30 ml of substrate mixtures: perlite-

Materiales y métodos

Medios de cultivo

Los medios de cultivo evaluados para el crecimiento de brotes adventicios de *Laelia anceps* Lindl. y *Epidendrum* sp. de 1.1 ± 0.1 cm, previamente regenerados *in vitro*, contenían las sales nutritivas del medio Murashige y Skoog (MS) al 50 y 100%, 30 g L^{-1} de sacarosa, 0 y 1 mg L^{-1} de ácido giberélico (AG_3), agar (7 g L^{-1}) ó 30 ml de las mezclas de sustratos: perlita-tezontle (PT) y fibra de coco-tezontle (FCT) en proporción 3:1 (tamaño de partícula de 0.5 mm). El pH de los medios se ajustó a 5.7-5.8.

Establecimiento de los cultivos

Los brotes adventicios se colocaron en frascos de vidrio de 250 ml que contenían 30 ml de los medios de cultivo descritos anteriormente más los sustratos PT, FCT o agar (Cuadro 1). Previamente, los frascos se esterilizaron en una autoclave durante 15 minutos a 120°C antes del establecimiento de los brotes (explantes).

Los cultivos se incubaron en un cuarto de crecimiento a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ y un fotoperiodo de 16 h proporcionado por lámparas de luz blanca fría fluorescente (intensidad lumínica $25 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

VARIABLES EVALUADAS

Después de 45, 90 y 135 días de iniciado el cultivo se evaluó la longitud del brote (desde el inicio de la raíz hasta la punta de la hoja más larga), el número de hojas y número de raíces; y el peso fresco se evaluó a los 60 días con ayuda de una balanza analítica.

Diseño experimental

El experimento se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Patología de Semillas del *Campus* Montecillo, Colegio de Postgraduados. Se usó un diseño experimental completamente al azar con tres factores: especie (2), sustratos (3) y medio de cultivo (4) resultando 24 tratamientos. Cada tratamiento tuvo 15 repeticiones y cada repetición consistió de un frasco con cinco brotes adventicios. A los datos de cada variable se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias mediante la prueba de Tukey (≤ 0.05). Ambos procedimientos se hicieron con el programa estadístico SAS v.9.0 (SAS Institute, 2002).

volcanic rock (PT) and coir-volcanic rock (FCT) in 3:1 ratio (0.5 mm particle size). The médium pH was adjusted to 5.7-5.8.

Planting of crops

Adventitious shoots were placed in 250 ml glass vials containing 30 ml of the culture medium described above plus the PT, FCT or agar substrates (Table 1). Previously, the flasks were sterilized in an autoclave for 15 minutes at 120°C before the establishment of the shoots (explants).

Cuadro 1. Tratamientos probados en el cultivo *in vitro* de *Laelia anceps* Lindl. y *Epidendrum* sp.

Table 1. Tested treatments in the *in vitro* culture of *Laelia anceps* Lindl. and *Epidendrum* sp.

| Tratamiento | Composición |
|-------------|---|
| MS100A | MS 100% con agar (testigo) |
| MS100FCT | MS 100% con fibra de coco-tezontle |
| MS100PT | MS 100% con perlita-tezontle |
| MS50A | MS 50% con agar |
| MS50FCT | MS 50% con fibra de coco-tezontle |
| MS50PT | MS 50% con perlita-tezontle |
| MS100-2A | MS 100% con agar y 1 mg L^{-1} de ácido giberélico |
| MS100-2FCT | MS 100% perlita-tezontle y 1 mg L^{-1} de ácido giberélico |
| MS100-2PT | MS 100% perlita-tezontle y 1 mg L^{-1} de ácido giberélico |
| MS50-2A | MS 50% con agar y 1 mg L^{-1} de ácido giberélico |
| MS50-2FCT | MS 50% con fibra de coco-tezontle y 1 mg L^{-1} de ácido giberélico |
| MS50-2PT | MS 50% con perlita-tezontle y 1 mg L^{-1} de ácido giberélico |

MS= Sales de Murashige y Skoog (1962).

Cultures were incubated in a growth room at $26 \pm 2^\circ\text{C}$ and a photoperiod of 16 h provided by cold white fluorescent lamps ($25 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ light intensity).

Evaluated variables

After 45, 90 and 135 days of initiating the crop, the length of the shoot (from the beginning of the root to the tip of the longest leaf), number of leaves and number of roots were evaluated; and the fresh weight was evaluated at 60 days using an analytical balance.

Resultados and discusión

Efecto de la especie

El análisis de los resultados reflejó que la especie tuvo un efecto significativo en la longitud del brote (45, 90 y 135 días), el número de hojas (45 días) y el número de raíces (90 y 135 días) (Cuadro 2). A los 45 días de cultivo, la especie *Epidendrum* sp., mostró mejor respuesta para longitud del brote; sin embargo, después de este tiempo fue *Laelia anceps* Lindl. la que presentó los valores más altos (Cuadro 3). El número de hojas de los brotes de *Laelia anceps* Lindl. después de 45 días fue más alto que en *Epidendrum* sp. pero a los 90 y 135 días ambas especies se comportaron de manera similar.

Por otra parte, para el número de raíces no hubo diferencias estadísticas durante los primeros 45 días entre ambas especies, pero después de este periodo *L. anceps* Lindl. mostró valores significativamente mayores que *Epidendrum* (Cuadro 3). En relación con estos resultados, el efecto del genotipo en el crecimiento *in vitro* también se observó en *Cattleya aurantiaca* Bateman, *Encyclia adenocaula* La Llave & Tex., *Laelia speciosa* Kunth., *Epidendrum radicans* Pav. Ex Lindl., *Euchile citrina* La Llave ex Lex., *Laelia albida* Bateman ex Lindl., *Laelia autumnalis* (Lex.) Lindl., *Oncidium cavendishianum* Bateman y *Oncidium tigrinum* La Llave & Lex. (Ávila y Salgado-Garciglia, 2006). Asimismo, Abdoli y Moieni (2003) encontraron que el genotipo influyó considerablemente en la inducción de la organogénesis en girasol (*Helianthus annuus* L.).

Cuadro 2. Suma de cuadrados del análisis de varianza para el efecto de la especie, los sustratos y medios de cultivo en la longitud del brote, número de hojas, número de raíces y peso fresco de *Laelia anceps* Lindl. y *Epidendrum* sp. después de 45, 90 y 135 días de cultivo.

Table 2. Squares sum of variance analysis for the effect of the species, substrates and culture medium on shoot length, number of leaves, number of roots and fresh weight of *Laelia anceps* Lindl. and *Epidendrum* sp. after 45, 90 and 135 days of culture.

| FV | GL | Logitud del brote (cm) | | | Número de hojas | | | Número de raíces | | | PF (g) |
|--------|-----|------------------------|--------|--------|-----------------|-------|---------|------------------|-------|---------|--------|
| | | 45 | 90 | 135 | 45 | 90 | 135 | 45 | 90 | 135 | 60 |
| E | 1 | 4.36** | 1.16* | 6.05** | 5.67* | 4.41 | 7.71 | 1.18 | 5.63* | 30.01** | 3509* |
| S | 2 | 2.75** | 0.09 | 1.85** | 1.64 | 2.02 | 5.75 | 0.14 | 1.91 | 4.51* | 229.77 |
| M | 3 | 2.7** | 0.17 | 1.02** | 1.06 | 1.27 | 5.26 | 1.23 | 2.88* | 8.91* | 4705** |
| E*M*S | 6 | 2.84** | 0.66** | 1.9** | 2.32* | 2.26* | 19.42** | 0.27* | 0.91* | 3.31** | 2338** |
| ERROR | 192 | 0.08 | 12.25 | 0.12 | 1.23 | 2.35 | 2.67 | 0.45 | 0.64 | 1.01 | 377 |
| CV (%) | | 21.6 | 21.89 | 18.83 | 27.6 | 21.8 | 27.17 | 58.89 | 78.79 | 52.69 | 42 |

**= $p \leq 0.01$; *= $p \leq 0.05$; CV= coeficiente del variación; E= especie; M= medio; S= sustrato; PF= peso fresco.

Experimental design

The experiment was carried out in the Laboratory of Biotechnology and Pathology of Seeds of *Campus* Montecillo, Colegio de Postgraduados. A completely randomized experimental design was used with three factors: species (2), substrates (3) and médium culture (4) resulting in 24 treatments. Each treatment had 15 replicates and each replicate consisted of one flask with five adventitious shoots. The data of each variable were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and the comparison of means by the Tukey test (≤ 0.05). Both procedures were performed with the SAS v.9.0 statistical program (SAS Institute, 2002).

Results and discussion

Effect of the species

The analysis of the results showed that the species had a significant effect on shoot length (45, 90 and 135 days), number of leaves (45 days) and number of roots (90 and 135 days) (Table 2). After 45 days of culture, the *Epidendrum* sp species, showed better response for shoot length; however, after this time it was *Laelia anceps* Lindl. which showed the highest values (Table 3). The number of leaves of the shoots of *Laelia anceps* Lindl. after 45 days was higher than *Epidendrum* sp. but at 90 and 135 days both species behaved in a similar way.

Cuadro 3. Efecto de la especie sobre longitud de brote, número de hojas y número de raíces a los 45, 90 y 135 días de iniciar el cultivo *in vitro*.

Table 3. Effect of the species on shoot length, number of leaves and number of roots at 45, 90 and 135 days after starting the *in vitro* cultivation.

| Especie | Longitud de brote (cm) | | | Número de hojas | | | Número de raíces | | |
|-----------------------|------------------------|-------|-------|-----------------|-------|-------|------------------|-------|-------|
| | 45 | 90 | 135 | 45 | 90 | 135 | 45 | 90 | 135 |
| <i>Laelia anceps</i> | 1.2 b | 1.7 a | 2 a | 4.2 a | 5.3 a | 6.2 a | 1.2 a | 1.2 a | 2.3 a |
| <i>Epidendrum</i> sp. | 1.5 a | 1.5 b | 1.7 b | 3.8 b | 5 a | 5.8 a | 1.1 a | 0.8 b | 1.5 b |
| DSH | 0.8 | 0.13 | 0.11 | 0.3 | 0.6 | 0.5 | 0.2 | 0.3 | 0.3 |

DSH= diferencia significativa honesta. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey \leq 0.05).

Efecto de los sustratos

Los sustratos tuvieron efecto significativo en la longitud de brote (45 y 135 días) y número de raíces a los 135 días (Cuadro 2). Después de 45 días de cultivo, la longitud de los brotes fue estadísticamente superior en perlita-tezontle (PT), pero a los 135 días los valores más altos se registraron en los brotes cultivados en agar, en tanto no se encontraron diferencias significativas en los tratamientos con fibra de coco-tezontle (FCT) y PT (Cuadro 4) (Figura 1). Con respecto a número de hojas, no se observaron diferencias significativas entre los brotes crecidos en los distintos sustratos y agar durante los 135 días que los brotes permanecieron *in vitro*.

Cuadro 4. Efecto de los sustratos en la longitud de brote, número de hojas y número de raíces a los 45, 90 y 135 días iniciado el cultivo.

Table 4. Effect of the substrates on shoot length, number of leaves and number of roots at 45, 90 and 135 days after cultivation.

| Sustrato | Longitud de brote (cm) | | | Número de hojas | | | Número de raíces | | |
|----------|------------------------|------|------|-----------------|------|------|------------------|------|------|
| | 45 | 90 | 135 | 45 | 90 | 135 | 45 | 90 | 135 |
| Agar | 1.2b | 1.7a | 2.1a | 4.1a | 5 a | 6.3a | 1.2a | 1.2a | 2.2a |
| FCT | 1.2b | 1.6a | 1.8b | 3.9a | 5.2a | 5.7a | 1.2a | 0.8a | 1.5b |
| PT | 1.4a | 1.5a | 1.7b | 4.1a | 5.4a | 6.1a | 1.1a | 1.0a | 2.1a |
| DSH | 0.11 | 0.2 | 1.6 | 0.4 | 0.8 | 0.7 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |

FCT= fibra de coco-tezontle; PT= perlita-tezontle; DSH= diferencia significativa honesta. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey \leq 0.05).

Asimismo, se observó que el número de raíces fue estadísticamente similar en agar, FCT y PT a los 45 y 90 días de cultivo; sin embargo, después de 135 días los brotes cultivados en FCT tuvieron un número de raíces

Moreover, for the number of roots there were no statistical differences during the first 45 days between the two species, but after this period *L. anceps* Lindl. showed significantly higher values than *Epidendrum* (Table 3). Regarding these results, the genotype effect on the *in vitro* growth was also observed in *Cattleya aurantiaca* Bateman, *Encyclia adenocaula* La Llave & Tex., *Laelia speciosa* Kunth., *Epidendrum radicans* Pav. Ex Lindl., *Euchile citrina* La Llave ex Lex., *Laelia albida* Bateman ex Lindl., *Laelia autumnalis* (Lex.) Lindl., *Oncidium cavendishianum* Bateman and *Oncidium tigrinum* La Llave & Lex. (Ávila and Salgado-Garciglia, 2006). Also, Abdoli and Moieni (2003) found that genotype greatly influenced the induction of organogenesis in sunflower (*Helianthus annuus* L.).

Effect of substrates

The substrates had a significant effect on shoot length (45 and 135 days) and number of roots at 135 days (Table 2). After 45 days of cultivation, shoot length was statistically higher in perlite-volcanic rock (PT), but at 135 days the highest values were recorded in shoots grown on agar, while no significant differences were found in treatments with coir-volcanic rock (FCT) and PT (Table 4) (Figure 1). With respect to the number of leaves, no significant differences were found between the shoots grown on different substrates and agar during the 135 days when shoots were kept *in vitro*.

It was also observed that the number of roots was statistically similar in agar, FCT and PT at 45 and 90 days of culture; however, after 135 days FCT-grown shoots had significantly fewer root numbers than those grown on agar or PT (Table 4). In this regard, Keatmetha and Suksa-Ard (2004) found that the use of vermiculite and peat moss during the *in vitro* culture of *Anthurium andraeanum* L. did not promote more roots compared to the use of phytigel.

significativamente menor que aquellos crecidos en agar o PT (Cuadro 4). Al respecto, Keatmetha y Suksa-Ard (2004) encontraron que el uso de vermiculita y peat most durante el cultivo *in vitro* de *Anthurium andraeanum* L. no promovieron mayor número de raíces con respecto al uso de phytigel.

Por su parte, Afreen-Zobayed *et al.* (2000) usaron diferentes combinaciones de vermiculita y pulpa de papel para sustituir el agar en cultivo *in vitro* de *Ipomoea batatas* L. obteniendo los mejores resultados en vermiculita con 30% de pulpa de papel. Asimismo, Labrousse *et al.* (2012) evaluaron sorbarod (tampón de celulosa), turba y pulpa de papel como soportes alternativos al agar en la micropropagación de *Nemesia denticulata* (Benth.) Grant ex Fourc., ellos encontraron que los sustratos promovieron el mejor desarrollo de raíces y mayor supervivencia en la aclimatación. Asimismo, Hazarika (2006) indica que las raíces de *Brassica oleracea* L. desarrolladas en agar tienen baja funcionalidad, lo que limita la supervivencia de las plantas durante el proceso de aclimatación. De la misma manera, Kozai (2010) y Oh *et al.* (2012) encontraron que los sustratos vermiculita, pulpa de papel y perlita aumentan la conductividad hídrica, lo que favorece la absorción de nutrientes por las plantas.

Efecto de medio de cultivo

Fue posible observar diferencias significativas en la longitud el brote (45 y 135 días), y el número de raíces después de los 90 y 135 de cultivo por efecto del medio (Cuadro 2). A los 45 días de iniciado el cultivo, los brotes crecidos en el medio MS al 50% con AG₃ (MS50-2) mostraron la mayor longitud, pero al final de la evaluación este medio y el que contenía las sales MS al 100% sin AG₃ no fueron estadísticamente diferentes (Cuadro 5). Al respecto, Coello *et al.* (2010) encontraron que el ácido giberélico fue el factor que promovió el alargamiento de los brotes de *Guarianthe skinneri* Bateman. Por otra parte, el número de hojas no fue significativamente diferente entre los distintos tratamientos a lo largo del cultivo. En contraste, Rodrigues *et al.* (2009) encontró que el uso de AG₃ en el crecimiento de *Cattleya loddigesii* Lindl. promovió un mayor número de hojas. Asimismo, sólo el número de raíces de los brotes crecidos en MS al 100% fue significativamente menor que el de aquellos que permanecieron en el medio MS al 50% y AG₃ después de 90 y 135 días de iniciado el cultivo (Cuadro 5).

Por su parte, Jara *et al.* (2007) utilizaron cuatro medios (MS 50%, MS 100%, medio Morel, medio Knudson para la germinación *in vitro* de *Chloraea virescens* (Willd.) Lindl., *Chloraea lamellata* Lindl. y *Gavilea araucana*

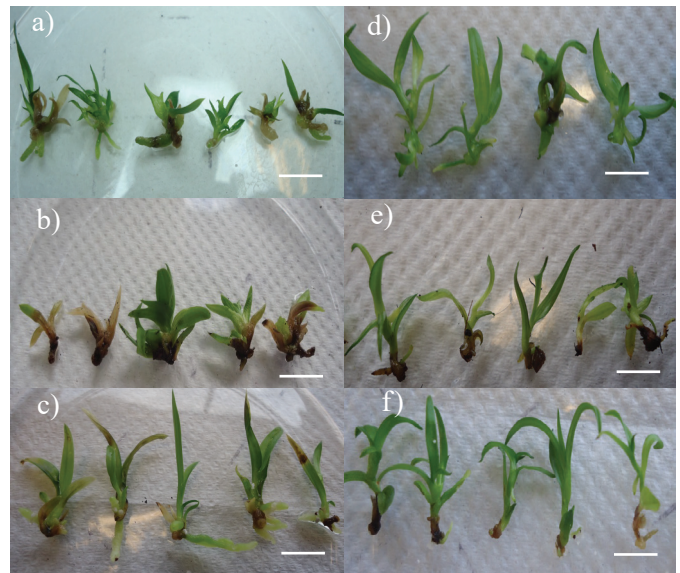


Figura 1. Brotes adventicios de *Laelia anceps* Lindl. (a, b, c) y *Epidendrum* sp. (d, e, f) 90 días después de iniciar el cultivo *in vitro*. Agar (a, d), fibra de coco-tezontle (b, e) y perlita-tezontle (c, f). Barra 1 cm.

Figure 1. Adventitious buds of *Laelia anceps* Lindl. (a, b, c) and *Epidendrum* sp. (d, e, f) 90 days after initiation of *in vitro* culture. Agar (a, d), coir-volcanic rock (b, e) and perlite-volcanic rock (c, f). Bar 1 cm.

Meanwhile, Afreen-Zobayed *et al.* (2000) used various combinations of vermiculite and paper pulp to replace agar for *in vitro* culture of *Ipomoea batatas* L. obtaining the best results with vermiculite with 30% paper pulp. Also, Labrousse *et al.* (2012) evaluated Sorbarod (buffer cellulose), peat and paper pulp as alternative supports to agar in micropropagation for *Nemesia denticulata* (Benth.) Grant ex Fourc., they found that substrates promoted better root development and increased acclimation survival. Also, Hazarika (2006) indicates that the roots of *Brassica oleracea* L. developed in agar have low functionality, limiting the survival of plants during the acclimatization process. Similarly, Kozai (2010) and Oh *et al.* (2012) found that substrates of vermiculite, paper pulp and perlite increase water conductivity, which favors the absorption of nutrients by plants.

Effect of culture medium

It was possible to observe significant differences in shoot length (45 and 135 days), and number of roots after 90 and 135 days of cultivation by medium effect (Table 2). At 45 days after starting the cultivation the shoots grown on MS medium with 50% AG₃ (MS50-2) showed the greatest

Phil., encontrando que el medio MS 50% indujo los mejores resultados en las especies estudiadas. De igual manera, Dalzotto (2013) reportó que la altura de planta, número de raíces y materia seca a los 95 días del cultivo *in vitro* de *Oncidium bifolium* (Sims) Dumort. fueron mayores en el medio MS 50%. Los resultados de este trabajo muestran que medios menos concentrados que contenían sales MS al 50% no limitaron el crecimiento de los brotes de *Laelia anceps* Lindl. y *Epidendrum* sp. lo que concuerda con lo obtenido por Pervin (1997), quien observó que las orquídeas de los generos *Vanda*, *Dendrobium*, *Aerides*, *Acampe* y *Apathoglottis* pueden desarrollarse en medios con pocos nutrientes (peptona, inositol, extracto de plátano o agua de coco).

length, but at the end of the evaluation this medium and the one containing MS salts at 100% without AG₃ showed no statistically differences (Table 5). In this regard, Coello *et al.* (2010) found that gibberellic acid was the factor that promoted shoot elongation of *Guarianthe skinneri* Bateman. On the other hand, the number of leaves was not significantly different between the different treatments throughout the crop. In contrast, Rodrigues *et al.* (2009) found that the use of AG₃ *Cattleya loddigesii* Lindl. growth promoted a greater number of leaves. Also, only the number of roots of shoots grown in MS at 100% was significantly lower than those remaining in MS medium at 50% and AG₃ after 90 and 135 days after starting the culture (Table 5).

Cuadro 5. Efecto del medio de cultivo en la longitud de brote, número de hojas y número de raíces después de 45, 90 y 135 días de cultivo.

Table 5. Effect of culture medium on shoot length, number of leaves and number of roots after 45, 90 and 135 days of cultivation.

| Medio de cultivo | Longitud de brote (cm) | | | Número de hojas | | | Número de raíces | | |
|------------------|------------------------|-------|--------|-----------------|-------|-------|------------------|--------|--------|
| | 45 | 90 | 135 | 45 | 90 | 135 | 45 | 90 | 135 |
| MS100 | 1.3 b | 1.6 a | 1.9 ab | 4.1 a | 5.1 a | 6.1 a | 1.2 a | 0.7 b | 1.5 b |
| MS50 | 1.2 b | 1.5 a | 1.7 b | 3.9 a | 5.4 a | 6.1 a | 1.2 a | 0.9 ab | 1.8 ab |
| MS100-2 | 1.1 b | 1.6 a | 1.7 b | 3.8 a | 4.9 a | 5.5 a | 0.9 a | 1 ab | 2 ab |
| MS50-2 | 1.6 a | 1.7 a | 2.1 a | 4.2 a | 5.2 a | 6.4 a | 1.3 a | 1.4 a | 2.3 a |
| DSH | 0.14 | 0.24 | 0.2 | 0.6 | 1.0 | 0.93 | 0.4 | 0.5 | 0.6 |

MS= sales de Murashige y Skoog; MS100= MS al 100%; MS50= MS al 50%; MS100-2= MS al 100% con 1 mg L⁻¹ de ácido giberélico; MS50-2= MS al 50% con 1 mg L⁻¹ de ácido giberélico; DSH= diferencia significativa honesta. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey ≤ 0.05).

Por su parte, Flores-Escobar *et al.* (2008) observaron que los brotes de *Oncidium stramineum* Lindl. cultivados en medio MS suplementado con extractos orgánicos (agua de coco, peptona, carbón activado, polivinilpirrolidona) alcanzaron una longitud de 2.05 cm de longitud en 90 días, valor muy cercano al obtenido en el medio que contenía 50% de las sales MS y 1 mg L⁻¹ de AG₃ (MS50-2), en un intervalo de tiempo similar.

Efecto de los tratamientos

Diferencias significativas se encontraron para la longitud el brote, el número de hojas y el número de raíces a los 45, 90 y 135 días en la interacción de los factores (Cuadro 2). Después de 135 días de cultivo, la longitud de los brotes de *L. anceps* Lindl. de los tratamientos con sales MS al 50%, AG₃ y agar (MS50-2A) y sales MS al 100% con agar (MS100-A) fue estadísticamente mayor que la de los otros tratamientos. No obstante, a los 90

Meanwhile, Jara *et al.* (2007) used four mediums (MS 50%, MS 100%, Morel medium, Knudson medium for *in vitro* germination of *Chloraea virescens* (Willd.) Lindl., *Chloraea lamellata* Lindl. and *Gavilea araucana* Phil., finding that the MS 50% medium induced the best results in the studied species. Similarly, Dalzotto (2013) reported that plant height, number of roots and dry matter at 95 days of *in vitro* culture of *Oncidium bifolium* (Sims) Dumort. were higher in the MS 50% medium. The results of this paper show that less concentrated media containing MS salts at 50% did not limit growth of shoots of *Laelia anceps* Lindl. and *Epidendrum* sp. which is consistent with the results of Pervin (1997), who observed that orchids of the genera *Vanda*, *Dendrobium*, *Aerides*, *Acampe* and *Apathoglottis* can grow in media with few nutrients (peptone, inositol, banana extract or coconut water).

Flores-Escobar *et al.* (2008) observed that shoots of *Oncidium stramineum* Lindl. cultured in MS medium supplemented with organic extracts (coconut water, peptone,

días sólo se apreciaron diferencias estadísticas entre los tratamientos MS50-2A y MS50A (MS 50% sin AG₃) y MS100-2PT (MS100%, AG₃ y perlita-tezontle) (Cuadro 6).

Lo anterior indica que los brotes de *L. anceps* Lindl. pueden crecer bien tanto en agar como en perlita-tezontle o vermiculita-perlita, y sales MS al 50 ó 100% con o sin AG₃ durante 90 días, y después de este tiempo el crecimiento es mejor en los medios gelificados con agar, indistintamente de la concentración de sales o AG₃. Estos resultados concuerdan con los de Martínez-Hernández *et al.* (2006) quienes evaluaron la germinación, multiplicación y enraizamiento de *Citrus volkameriana* Ten & Pasq., *Citrumelo swingle* (*Citrus Paradise* Macfad cv. Duncan x *Poncirus Trifolia* L.) y Citrange en vermiculita, perlita y tezontle, no encontrando diferencias estadísticas significativas entre estos y los tratamientos con agar.

Cuadro 6. Efecto de los tratamientos en la longitud del brote de *Laelia anceps* Lindl. y *Epidendrum sp.* a 45, 90 y 135 días del cultivo.

Table 6. Effect of treatments on shoot length of *Laelia anceps* Lindl. and *Epidendrum sp.* at 45, 90 and 135 days of culture.

| Tratamiento | <i>Laelia anceps</i> | | | <i>Epidendrum sp.</i> | | |
|-------------|----------------------|--------|---------|-----------------------|--------|---------|
| | 45 | 90 | 135 | 45 | 90 | 135 |
| MS100A | 1.3 b | 2 ab | 2.9 a | 1.2 b | 1.4 ab | 2.1 c-e |
| MS100FCT | 1.2 b | 1.5 ab | 1.5 fg | 1.3 b | 1.5 ab | 1.6 e-g |
| MS100PT | 1.3 b | 1.7 ab | 2 c-f | 1.2 b | 1.6 ab | 1.5 e-g |
| MS100-2A | 1.1 b | 1.9 ab | 1.9 c-g | 1.2 b | 1.6 ab | 1.5 e-g |
| MS100-2FCT | 1.2 b | 2 ab | 2.4 b-d | 1.1 b | 1.3 b | 1.6 e-g |
| MS100-2PT | 1.1 b | 1.4 b | 1.3 g | 1.2 b | 1.6 ab | 1.7 d-g |
| MS50A | 1.1 b | 1.3 b | 1.3 g | 1.3 b | 1.6 ab | 1.6 e-g |
| MS50-FCT | 1.1 b | 1.7 ab | 1.8 c-g | 1.4 b | 1.6 ab | 1.7 e-g |
| MS50PT | 1.2 b | 1.8 ab | 2.4 bc | 1.2 b | 1.3 b | 1.5 e-g |
| MS50-2A | 1.2 b | 2.3 a | 3.4 a | 1.2 b | 1.32 b | 1.8 c-g |
| MS50-2FCT | 1.1 b | 1.4 b | 1.6 e-g | 1.2 b | 1.7 ab | 1.8 c-g |
| MS50-2PT | 1.2 b | 2 ab | 2 c-f | 3.9 a | 1.6 ab | 1.7 e-g |
| DSH | | | | 0.5 | 0.8 | 0.7 |

DSH = diferencia significativa honesta. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey ≤ 0.05).

Asimismo, estos autores mencionan que la supervivencia durante la aclimatación fue mayor en las plantas provenientes de sustratos, ya que las de agar sufrían estrés provocado por el rompimiento de raíces, causando su muerte. Afreen-Zobayed *et al.* (2000) observaron que los tratamientos a base de agar en la micropropagación de *Ipomoea batatas* L. quedaron por debajo de los tratamientos a base de vermiculita y pulpa de papel.

activated charcoal, polyvinylpyrrolidone) reached a length of 2.05 cm in 90 days, which is a very close to that obtained in the medium containing 50% of the MS salts and 1 mg L⁻¹ of AG₃ (MS50-2) in a similar time interval.

Effect of treatments

Significant differences were found for shoot length, number of leaves and number of roots at 45, 90 and 135 days in the interaction factors (Table 2). After 135 days of cultivation, the shoot length in *L. anceps* Lindl. in the treatments of MS salts at 50%, AG₃ and agar (MS50-2A) and 100% MS salts with agar (MS100-A) was statistically higher than the other treatments. However, at 90 days only statistical differences between treatments MS50-2A and MS50A (MS 50% without AG₃) and MS100-2PT (MS100%, AG₃ and perlite-volcanic rock) (Table 6) were observed.

This indicates that outbreaks of *L. anceps* Lindl. can grow properly in both agar and perlite-volcanic rock or vermiculite-perlite, and MS salts at 50 or 100% with or without AG₃ for 90 days, and after this time the growth is better in the media gelled with agar, despite the concentration of salts or AG₃. These results agree with those of Martínez *et al.* (2006) who evaluated the germination, multiplication and rooting of *Citrus volkameriana* Ten & Pasq., *Citrumelo*

A diferencia de lo observado en *L. anceps* Lindl. en *Epidendrum* sp. no se encontraron diferencias significativas en la longitud de los brotes sometidos a los distintos tratamientos probados a lo largo del periodo de cultivo (Cuadro 6).

Por otro lado, no existieron diferencias significativas para el número de hojas formadas en los brotes de *L. anceps* Lindl. y los brotes *Epidendrum* sp. después de los 45 y 90 días, pero a los 135 días sólo *Epidendrum* sp. del tratamiento MS50A (MS 50%, agar) tuvo un número de hojas estadísticamente diferente, mientras que para *L. anceps* Lindl. el tratamiento MS50 PT (MS 50% perlita-tezontle) indujo la formación de un mayor número de hojas (Cuadro 7).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Martínez-Hernández *et al.* (2009) investigadores que evaluaron vermiculita como sustituto de agar en *Citrus volkameriana* Ten & Pasq., *Citrumelo swingle* (*Citrus paradise* Macfad cv. Duncan × *Poncirus trifolia* L.) y C-35 y encontraron en sus valores obtenidos que el número de hojas no presentaron diferencias estadísticas significativas durante las primeras ocho semanas del crecimiento *in vitro*.

Cuadro 7. Efecto de los tratamientos en el número de hojas de *Laelia anceps* Lindl. y *Epidendrum* sp. a los 45, 90 y 135 días después del inicio del experimento.

Table 7. Effect of treatments on the number of leaves of *Laelia anceps* Lindl. y *Epidendrum* sp. at 45, 90 and 135 days after the beginning of the experiment.

| Tratamiento | <i>Laelia anceps</i> | | | <i>Epidendrum</i> sp. | | |
|-------------|----------------------|-------|---------|-----------------------|-------|---------|
| | 45 | 90 | 135 | 45 | 90 | 135 |
| MS100A | 4.9 a | 5.4 a | 6.7 a-e | 3.9 a | 5.2 a | 5.9 a-e |
| MS100FCT | 3.9 a | 4.4 a | 5.3 b-e | 3.9 a | 5 a | 5.4 a-e |
| MS100PT | 4.6 a | 5 a | 5.3 b-e | 3.8 a | 5.8 a | 7.9 a-c |
| MS100-2A | 3.7 a | 4 a | 4 e | 4 a | 5.2 a | 5.1 b-e |
| MS100-2FCT | 4.7 a | 6.2 a | 7.1 a-e | 3.7 a | 6 a | 6.6 a-e |
| MS100-2PT | 3.3 a | 3.6 a | 5.1 b-e | 3.6 a | 4.6 a | 6 a-e |
| MS50A | 3.3 a | 4.4 a | 5.1 b-e | 3.8 a | 5.4 a | 8.6 a |
| MS50-FCT | 4 a | 5 a | 4.9 c-e | 4.2 a | 5.8 a | 5.7 a-e |
| MS50PT | 4.8 a | 6.8 a | 7.9 a-c | 3.6 a | 5.2 a | 4.3 de |
| MS50-2A | 4.7 a | 4.6 a | 6.6 a-e | 4.8 a | 5.4 a | 8.1 ab |
| MS50-2FCT | 3.4 a | 4.2 a | 5 b-e | 3.3 a | 4.8 a | 5.3 b-e |
| MS50-2PT | 5 a | 6.2 a | 7.4 a-d | 3.9 a | 6 a | 6 a-e |
| DSH | | | | 1.9 | 3.6 | 3.2 |

DSH= diferencia significativa honesta. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey ≤ 0.05).

Por otra parte, Xiao y Kozai (2006) probaron un material poroso (Florialite) alternativo al agar en el crecimiento de *Limonium latifolium* Lindl. y encontraron diferencias

Swingle (*Citrus Paradise* Macfad cv. Duncan × *Poncirus Trifolia* L.) and Citrange in vermiculite, perlite and volcanic rock, without finding significant statistical differences between these and the treatments with agar.

These authors also mention that survival during acclimatization was greater in plants coming from substrates, since the agar ones suffered stress caused by the rupture of roots, causing their death. Afreen-Zobayed *et al.* (2000) found that treatments based on agar in the micropropagation of *Ipomoea batatas* L. were below the treatments based on vermiculite and paper pulp.

Unlike what was observed in *L. anceps* Lindl. in *Epidendrum* sp. no significant differences were found in the length of the shoots submitted to the different treatments tested throughout the growing period (Table 6).

On the other hand, there were no significant differences in the number of leaves formed in shoots of *L. anceps* Lindl. and *Epidendrum* sp. after 45 and 90 days, but at 135 days only *Epidendrum* sp. of the MS50A treatment (50% MS agar) had a statistically different number leaves, while for *L. anceps* Lindl. the treatment MS50PT (MS 50% perlita-volcanic rock) induced the formation of a larger number of leaves (Table 7).

These results agree with those of Martínez-Hernández *et al.* (2009) who evaluated vermiculite as a substitute for agar in *Citrus volkameriana* Ten & Pasq., *Citrumelo swingle*

estadísticas significativas en el área foliar, peso seco y fresco durante los primeros 25 días de cultivo. Al respecto, los resultados obtenidos en esta investigación indican que cultivar los brotes de *L. anceps* Lindl. y *Epidendrum* sp. en medios con el 50% de las sales y las mezclas de perlita-tezontle o perlita-fibra de coco y sin AG₃ promueve un número similar de hojas al de aquellos cultivados en las sales MS al 100% y agar.

A los 135 días se observó que sólo los brotes de *L. anceps* Lindl. que se cultivaron en el tratamiento MS50-A formaron un número de raíces significativamente menor que el de aquellos del tratamiento MS50-FCT (Cuadro 8). Para *Epidendrum* sp. los tratamientos MS100FCT y MS50-2FCT indujeron un menor número de raíces. En ese mismo intervalo de tiempo, los brotes de *Epidendrum* sp. cultivados en el tratamiento MS100A-2A sólo mostraron ser significativamente más eficientes para formar raíces que los de los tratamientos MS50-PT, MS50-A, MS100-2PT, MS100-2FCT, MS100-FCT y MS100-A (Cuadro 8).

Al respecto, Xia y Kozai (2006) encontraron que los brotes de *Limonium latifolium* Lindl. formaron mayor número de raíces en Florialite, que en agar. Por su parte, Mohan *et al.* (2004) usaron residuos orgánicos de caña de azúcar como sustituto del agar en el enraizamiento *in vitro* de manzano (*Malus prunifolia* Borkh.) y obtuvieron un incremento de 63% en el número de raíces.

(*Citrus paradise* Macfad cv. Duncan × *Poncirus trifolia* L.) and C-35 and found that the number of leaves did not show statistically significant differences in the first eight weeks of *in vitro* growth.

On the other hand, Xiao and Kozai (2006) tested a porous material (Florialite) alternative to agar for *Limonium latifolium* Lindl. growth and found significant statistical differences in leaf area, dry and fresh weight during the first 25 days of cultivation. In this regard, the results obtained in this research indicate that growing outbreaks of *L. anceps* Lindl. and *Epidendrum* sp. in media with 50% of the salts and mixtures of perlite-volcanic rock or perlite-coir without AG₃ promotes a similar number of sheets to those grown in the MS salts at 100% and agar.

After 135 days it was observed that only the shoots of *L. anceps* Lindl. which were cultivated in the MS50-A treatment formed significantly fewer roots than those in the MS50-FCT treatment (Table 8). For *Epidendrum* sp. the MS100FCT treatments and MS50-2FCT induced a lower number of roots. At that same time interval, the shoots of *Epidendrum* sp. cultivated in the treatment MS100A-2A showed to be significantly more efficient to form roots than those of the MS50-PT, MS50-A, MS100-2PT, MS100-2FCT, MS100-FCT y MS100-A treatments (Table 8).

Cuadro 8. Efecto de los tratamientos en el número de raíces de *Laelia anceps* Lindl. y *Epidendrum* sp. después de 45, 90 y 135 días de cultivo.

Table 8. Effect of treatments on the number of roots of *Laelia anceps* Lindl. y *Epidendrum* sp. after 45, 90 and 135 days of culture.

| Tratamiento | <i>Laelia anceps</i> | | | <i>Epidendrum</i> sp. | | |
|-------------|----------------------|---------|---------|-----------------------|---------|---------|
| | 45 | 90 | 135 | 45 | 90 | 135 |
| MS100A | 1.1 a-c | 1 a-c | 2.1 b-f | 1.6 ab | 0.8 bc | 1.1 d-f |
| MS100FCT | 0.9 a-c | 0.4 bc | 1.4 c-f | 1.1 a-c | 0.2 bc | 0.4 f |
| MS100PT | 1.1 a-c | 1 a-c | 2.3 b-f | 1.33 a-c | 1 a-c | 1.9 b-f |
| MS100-2A | 1.2 a-c | 2 ab | 2.6 b-e | 0.7 a-c | 1.4 a-c | 3.1 a-c |
| MS100-2FCT | 1.3 a-c | 0.8 bc | 2.1 b-f | 1.1 a-c | 1 a-c | 1 d-f |
| MS100-2PT | 0.9 a-c | 0.8 bc | 1.9 b-f | 0.3 c | 0.2 bc | 1 ef |
| MS50A | 0.9 a-c | 0.6 bc | 0.7 ef | 1.1 a-c | 0.4 bc | 1.1 d-f |
| MS50-FCT | 1.8 a | 1.6 a-c | 3 a-d | 1.4 a-c | 1.4 a-c | 2.4 b-e |
| MS50PT | 1.1 a-c | 1.4 a-c | 2.4 b-e | 1 a-c | 0.4 bc | 1.1 d-f |
| MS50-2A | 1.4 a-c | 2.8 a | 4.9 a | 1.4 a-c | 1 a-c | 2.1 b-f |
| MS50-2FCT | 1.2 a-c | 0.4 bc | 0.9 ef | 0.4 a-c | 0.4 bc | 0.4 f |
| MS50-2PT | 1.7 a-c | 1.8 a-c | 3.7 ab | 1.3 a-c | 2 ab | 2 b-f |
| DSH | | | | 1.2 | 1.9 | 2 |

DSH= diferencia significativa honesta. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey ≤ 0.05).

Se ha documentado que las raíces formadas en medios con agar suelen ser delgadas y frágiles, mismas que se dañan durante el trasplante, lo que ocasiona la pérdida de individuos (Debergh y Maene, 1981; Roberts y Smith 1990).

En el Cuadro 2 se observan diferencias significativas para el peso fresco de los brotes a 60 días de cultivo. Asimismo, sólo se encontraron diferencias significativas entre los brotes de *L. anceps* Lindl. del testigo (MS100A) y los tratamientos MS100-PT, MS100-2PT, MS100A para la variable peso fresco (Cuadro 9). En tanto que para *Epidendrum* sp. el peso fresco de los brotes del testigo fue estadísticamente similar al de los tratamientos MS50-FCT, MS50-PT, MS50-2FCT, MS50-2PT. En relación con esto, al estudiar el efecto de la vermiculita como sustituto del agar en *Carica papaya* L. Kataoka (1994) encontró que el peso fresco de las raíces era mayor en los explantes desarrollados en agar. En el presente estudio el uso de sustratos, medios diluidos y la adición de ácido giberélico (AG₃) no tuvieron efectos negativos en el peso fresco de *L. anceps* Lindl. y *Epidendrum* sp.

Cuadro 9. Peso fresco de los brotes de *Laelia anceps* Lindl. y *Epidendrum* sp. después de 60 días de cultivo *in vitro*.

Table 9. Fresh weight of *Laelia anceps* Lindl. and *Epidendrum* sp. Shoots after 60 days of *in vitro* culture.

| Tratamientos | Peso fresco (g) | |
|--------------|----------------------|-----------------------|
| | <i>Laelia anceps</i> | <i>Epidendrum</i> sp. |
| MS100A | 70.8 a | 50.4 a-d |
| MS100FCT | 42.4 a-d | 41 a-d |
| MS100PT | 36.4 b-d | 28.3 cd |
| MS100-2A | 39 a-d | 35.6 b-d |
| MS100-2FCT | 57.2 ac | 47.9 a-d |
| MS100-2PT | 32 cd | 39.7 a-d |
| MS50A | 22.7 d | 52.6 a-d |
| MS50-FCT | 54.4 a-d | 38.5 b-d |
| MS50PT | 47.3 a-d | 41.5 a-d |
| MS50-2A | 45.6 a-d | 45.6 a-d |
| MS50-2FCT | 33.5 b-d | 38.2 b-d |
| MS50-2PT | 65.3 ab | 53.5 a-d |
| DSH | 31.8 | 31.8 |

DSH= diferencia significativa honesta. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey ≤ 0.05).

En el presente trabajo, los mejores tratamientos evaluados podrían formar un protocolo en el que se utilicen medios de cultivo diluidos y sustratos como sustitutos del agar. Este protocolo representa una alternativa para la propagación

In this regard, Xia and Kozai (2006) found that the shoots of *Limonium latifolium* Lindl. formed a greater number of roots in Florialite than in agar. On the other hand, Mohan *et al.* (2004) used organic sugar cane residues as a substitute for agar in the *in vitro* rooting of apple trees (*Malus prunifolia* Borkh.) and obtained a 63% increase in the number of roots.

It has been documented that roots formed in mediums with agar are usually thin and fragile, which are damaged during transplantation, leading to the loss of individuals (Debergh and Maene 1981; Roberts and Smith 1990).

Table 2 shows significant differences for the fresh weight of shoots at 60 days of cultivation. Also, significant differences between *L. anceps* Lindl control shoots (MS100A) and treatments MS100-PT, MS100-2PT, MS100A for the fresh weight variable, were found (Table 9). While for *Epidendrum* sp. the fresh weight of the control shoots was statistically similar to the treatments MS50-FCT, MS50-PT, MS50-2FCT, MS50-2PT. In this regard, when studying the effect of vermiculite as a substitute for agar in *Carica papaya* L. Kataoka (1994) it was found that fresh root weight was higher in the explants developed in agar. In this research the use of substrates, diluted mediums and addition of gibberellic acid (AG₃) had no negative effect on the fresh weight of *L. anceps* Lindl. and *Epidendrum* sp.

In this research, the best evaluated treatments could become a protocol in which diluted culture mediums and substrates are used as substitutes for the agar. This protocol represents an alternative to the *in vitro* propagation of *L. anceps* Lindl. and *Epidendrum* sp. Which is efficient and has a lower cost. This decrease in cost is attributed to the reduction in the concentration of nutrient salts and AG₃, but especially to the use of inexpensive substrates, which unlike agar, represents only 13 to 17% of the cost.

Conclusions

The use of less concentrated culture medium without AG₃ and substrates as support, allowed the growth of *L. anceps* Lindl. and *Epidendrum* sp. plants with the same or greater efficiency than the conventional gelled with agar culture method. Replacing agar with substrata and use of culture medium with diluted salts without AG₃, not only allows

in vitro de *L. anceps* Lindl. y *Epidendrum* sp. eficiente y a un costo menor. Dicha disminución en el costo se atribuye a la reducción en la concentración de las sales nutritivas y AG₃, pero sobre todo al uso de sustratos baratos, los cuales a diferencia del agar, sólo contribuyen con 13 a 17% del costo del mismo.

Conclusiones

El uso de medios de cultivo menos concentrados, sin AG₃ y sustratos como soporte, permitió el crecimiento de las plantas de *L. anceps* Lindl. y *Epidendrum* sp. con la misma o mayor eficiencia que el método de cultivo convencional gelificado con agar. La sustitución del agar por sustratos y el uso de medios de cultivo con sales diluidas sin AG₃ no sólo permite el crecimiento *in vitro* de los brotes de las especies de orquídea en estudio, sino que puede reducir los costos de producción de las plantas propagadas mediante esta técnica.

Literatura citada

- Abdoli, M. and Moieni, A. H. D. 2003. Effects of genotype and cotyledon section on organogenesis in sunflower. *Ir. J. Biotechnol.* 1:134-138.
- Afreen, Z. F.; Zobayed, S. M. A. C.; Kubota, T.; Kozai, O. and Hasegawa, A. 1999. Supporting material affects the growth and development of *in vitro* sweet potato plantlets cultured photoautotrophically. *In vitro Cellular Develop. Biol. Plant.* 35: 470-474.
- Afreen, Z. F.; Zobayed, S. M. A. C.; Kubota, T.; Kozai, O. and Hasegawa, A. 2000. Combination of vermiculite and paper pulp supporting material for the photoautotrophic micropropagation of sweet potato. *Plant Sci.* 157: 225-231.
- Ávila, D. I. y Salgado, G. G. R. 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Biológicas.* 8:138-149.
- Bhagwat, B.; Vieira, L. G. E. and Erickson, L. R. 1996. Stimulation of *in vitro* shoot proliferation from nodal explants of cassava by thidiazuron, benzyladenine and gibberellic acid. *Plant Cell Tissue Organ Culture.* 46:1-7.
- Coello, C. Y.; Miceli, C. L.; Orantes, C.; Dendooven, L. F. and Gutiérrez, A. 2010. Plant growth regulators optimization for *in vitro* cultivation of the orchid *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressier & W. E. Higgins. *Gayana Bot.* 67:19-26.
- Dalzotto, C. A. 2013. Efecto de medios de cultivo en el crecimiento *in vitro* de *Oncidium bifolium* Sims. "federal". *Rev. Cientif. Agrop.* 17:7-15.
- Debergh, P. C. and Maene, L. J. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Sci. Hortic.* 14:335-345.

the *in vitro* growth of shoots of orchid species under study, but may reduce the production costs of plants propagated by this technique.

End of the English version



- DOF (Diario Oficial De La Federación). 2002. Norma Oficial Mexicana. NOM-059-ECOL. 2001. Segunda Sección, Anexo narrativo II. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 95-190 pp.
- Flores, E. G.; Legaria, S. J. P.; Gil, V. I. y Colinas, L. M. T. 2008. Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. Una orquídea amenazada y endémica de México. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 14:347-353.
- Fujiwara, K. C.; Yamauchi, T. and Kozai, K. 1993. Effects of culture media components on the oxygen diffusion coefficient in liquid and gelled media. *Abstr. Japan Plant Cell Tissue Culture Meeting, Kyoto, Japan.* 40 p.
- González, M.; Mogollón, N.; Alvarado, G.; Giménez, A. y Capote, T. 2012. Efecto del medio de cultivo *in vitro* y la fuente nitrogenada sobre el crecimiento del Cocuy (*Agave cocui* TRELEASE). *Bioagro.* 24:39-44.
- Hágsater, E.; Soto, A. M. A.; Salazar, C. G. A.; Jiménez, M. M. A.; López, R. Y. y Dressler, R. L. 2005. Las orquídeas de México. Instituto hinoín. México. 304 p.
- Halbinger, F. M. and Soto, A. M. A. 1997. Laelias of México. *Orquídea (Méx.) México, D. F.* 15: 160 p.
- Hazarika, B. N. 2006. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Sci. Hortic.* 108:105-120.
- Ichimura, K. and Oda M. 1998. Stimulation of root growth of several vegetables by extracts from a commercial preparation of agar. *J. Japan Soc. Hortic. Sci.* 67:341-346.
- Jara, G.; Seemann, P.; Durán, C. y Soto, S. 2007. Multiplicación *in vitro* y caracterización citológica de dos especies de orquídeas nativas (*Chloraea* y *Gavilea*) de la provincia de Valdivia, Chile. *Agro Sur.* 35:43-44.
- Kataoka, I. 1994. Influence of rooting substrates on the morphology of papaya root formed *in vitro*. *Japanese J. Tropical Agric.* 38:151-157.
- Keatmetha, W. and Suksa, A. P. 2004. Effects of rooting substrates on *in vitro* rooting of *Anthurium andraeanum* L. cv. avanti. *Walailak J. Sci. Technol.* 1:49-55.
- Kozai, T. 2010. Photoautotrophic micropropagation-environmental control for promoting photosynthesis. *Propagation ornamental plants.* 10:188-204.
- Labrousse, P.; Delmail, D.; Decou, P.; Carlúe, M.; Lhernould, S. and Krausz, P. 2012. *Nemesia* root hair response to paper pulp substrate for micropropagation. *The Sci. World J.* 1:1-7.
- Li, L. and Qu, R. 2002. *In vitro* somatic embryogenesis in turf-type bermudagrass: roles of abscisic acid and gibberellic acid, and occurrence of secondary somatic embryogenesis. *Plant Breed.* 121:155-158.
- Lucchesini, M.; Monteforti, G.; Mensuali, S. A. and Serra, G. 2006. Leaf ultrastructure, photosynthetic rate and growth of myrtle plantlets under different *in vitro* culture conditions. *Biol. Plant.* 50:161-168.

- Maheshwari, R.; Shailini, C.; Veluthambi, K. and Mahadevan, S. 1980. Interaction of gibberellic acid and indole-3-acetic acid in the growth of excised cuscuta shoot tips *in vitro*. *Plant Physiol.* 65:186-192.
- Martínez, H. M. J.; Alonso, L. A.; Osorio, A. F.; Gallardo, L. F.; López, M. H. y Mata, M. R. M. 2006. Cultivo *in vitro* de patrones de cítricos tolerantes al virus de la tristeza, empleando sustratos inertes alternativos al agar. *Interciencia.* 38:616-619.
- Martínez, H. M. J.; Alonso, L. A.; Osorio, A. F.; Gallardo, L. F.; López, M. H. y Mata, R. M. 2009. Evaluación de diferentes fuentes de carbohidratos y medios de soporte, para la multiplicación *in vitro* de portainjertos de cítricos tolerantes a la tristeza. *Agron. Trop.* 59:343-350.
- Mohan, R.; Soccol, C. R.; Quoirin, M. and Pandey, A. 2004. Use of sugarcane bagasse as an alternative low-cost support material during the rooting stage of apple micropropagation. *In vitro Cellular Develop. Biol-Plant.* 40:408-411.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Oh, M. M.; Seo, J. H.; Park, J. S. and Son, J. E. 2012. Physicochemical properties of mixtures of inorganic supporting materials affect growth of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets cultured photoautotrophically in a nutrient-circulated micropropagation system. *Horticulture Environ. Biotechnol.* 53:497-504.
- Pervin, S. 1997. Studies on large scale plantlets development in different orchid species and hybrid through *in vitro* culture. M. Sc. Thesis, Univ. Dhaka. Dhaka, Bangladesh. 101.
- Raya, M. Y. A.; Carrillo, G. C.; Pedraza, S. M. E.; Corona, T. T.; Carrillo, S. A. y Alcántar, G. G. 2011. Propagación *in vitro* de *Laelia halbingiana*. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 3:539-553.
- Roberts, A. V. and Smith, E. F. 1990. The preparation *in vitro* of chrysanthemum for transplantation to soil. I. Protection of roots by cellulose plugs. *Plant Cell, Tissue Organ Culture.* 21:129-132.
- Rodrigues, S. J. D.; Gomes, A. I. A.; Pasqua, M.; Almendagna, R. F. e Aparecida, A. F. 2009. Concentrações de sais do meio knudson C e de ácido giberélico no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea. *Ciência Rural, Santa Maria.* 39:772-777.
- Romero, T. R.; Luna, R. B. S. y Barba, A. A. 2007. Uso de complejos comerciales como sustitutos de componentes del medio de cultivo en la propagación *in vitro* de *Laelia anceps*. *Lankesteriana.* 7: 353-356.
- Salazar, M. A. S.; Amaya, N. Z. A. y Barrientos, R. F. 2013. Evaluación de diferentes medios de cultivo *in vitro* en el desarrollo de híbridos de Phalaenopsis (Orchidaceae). *Rev. Colomb. Biotecnol.* 15:97-105.
- SAS, Institute. 2002. User's guide of SAS (Statistical Analysis System). SAS Institute Inc. Cary, N. C. USA. 550.
- Soto, A. M. A. y Salazar, G. A. 2004. Orquídeas. Biodiversidad de Oaxaca. García, M. A. J.; Ordóñez M. J. y Briones-Salas, M. (Eds.). World Wildlife Fund. México. 271-295 pp.
- Téllez, V. M. A. 2011. Diagnóstico de la familia Orchidaceae en México. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Chapingo, Estado de México. 181.
- Xiao, Y. and Kozai, T. 2006. Photoautotrophic growth and net photosynthetic rate of sweet potato plantlets *in vitro* as affected by the number of air exchanges of the vessel and type of supporting material. *Tsinghua Sci. Technol.* 11:481-489.
- Zettler, L. W.; Stewart, S. S.; Bowles, L. M. and Jacobs, A. K. 2001. Mycorrhizal fungi and cold-assisted symbiotic germination of the federally threatened eastern prairie fringed orchid, *Platanthera Leucophaea* (Nuttall) Lindley. *The Am. Midland Nat.* 145:168-17.