

Propagación *in vitro* de *Galeandra greenwoodiana* y *Stanhopea hernandezii*

Carlos Alberto López y Mónica Rangel-Villafranco

División de Desarrollo Sustentable

Universidad Intercultural del Estado de México

San Felipe del Progreso, Méx.; México

carlos_lds12@hotmail.com, rangelmovi@yahoo.com.mx

Abstract— The Orchidaceae family is one of the most diverse in our country, which is threatened by the illegal extraction to which they have been subjected, for its beauty. The objective of this work was to carry out the *in vitro* propagation of *Galeandra greenwoodiana* and *Stanhopea hernandezii* in modified Murashige and Skoog (1962) media, added with organic compounds. Obtaining a percentage of germination greater than 50%, in addition they were able to obtain seedlings of *G. greenwoodiana* in a period of 6 to 8 months. Thus, a propagation protocol for *G. greenwoodiana* was established to help prevent the illegal plundering of this species from its natural habitat. The most effective treatment in propagation was Msm+Coco.

Keyword— *Conservation, MS media, organic attachments, Mexican orchids, ornamental potential, growth hormones, organic attachments.*

Resumen— La familia Orchidaceae es una de las más diversas en nuestro país, la cual está amenazada por la extracción ilegal a la que han estado sujetas, por su belleza. El objetivo de este trabajo fue llevar a cabo la propagación *in vitro* de *Galeandra greenwoodiana* y *Stanhopea hernandezii* en medio Murashige y Skoog (1962) modificado, adicionado con compuestos orgánicos. Obteniendo un porcentaje de germinación mayor al 50%, además se lograron obtener plántulas de *G. greenwoodiana* en un periodo de 6 a 8 meses. Así se logró establecer un protocolo de propagación para *G. greenwoodiana* el cual ayudara a evitar el saqueo ilegal de esta especie de su hábitat natural. El tratamiento más efectivo en la propagación fue Msm+Coco.

Palabras claves— *Conservación, medio MS, aditamentos orgánicos, orquídeas mexicanas, potencial ornamental, hormonas de crecimiento.*

I. INTRODUCCIÓN

México es un país megadiverso, se estima que alberga entre el 10 y 12% del total de la diversidad biológica, ocupando el cuarto lugar en diversidad vegetal a nivel mundial, resultado de la combinación de distintos factores como: historia geológica, posición geográfica, diversidad de altitudes, climas y orografía. Condiciones que favorecen la creación de microclimas que propician una gran cantidad de endemismos [1].

Para la familia Orchidaceae se reportan más de 1 200 especies dentro del territorio mexicano distribuidas en distintos ecosistemas, de las cuales 444 especies son endémicas es decir el 40% de la orquideoflora nacional [2]. Este grupo de plantas, es una de las más diversas, pero también una de las más vulnerables, debido a la destrucción de su hábitat y la extracción a la que ha estado sujeta, siendo esto el resultado del interés hortícola y comercial que ha despertado en diversas regiones del país [3]. Sin embargo este comercio se basa en la libre extracción de las poblaciones naturales propiciando una desaparición de las mismas que ha llevado a tener 185 especies en la Norma Oficial Mexicana de protección al ambiente [4]. Por lo que se deben considerar la implementación de estrategias para establecer un manejo sustentable de las orquídeas, entre estas acciones se pueden establecer métodos de propagación *in vitro* para conseguir una reproducción masiva de estas a partir de semillas y aclimatarlas

ex vitro en invernadero en condiciones controladas contribuyendo a la conservación y el aprovechamiento comercial para cubrir la demanda, reducir la extracción de su hábitat natural y venta ilegal de las mismas.

Se propone el uso del cultivo in vitro ya que ha sido utilizado de forma extensiva en la propagación y conservación de recursos fitogenéticos; además, la germinación in vitro es importante para la producción comercial de muchas especies e híbridos de orquídeas [5]. Por lo que su implementación es una alternativa de propagación de especies silvestres con problemas, por métodos convencionales y poblaciones reducidas, siendo indispensable para la conservación y comercialización, de estas especies [6].

Una de las variantes dentro del cultivo in vitro es la adición de compuestos orgánicos al medio de cultivo basal. Entre los más utilizados en la micro propagación de orquídeas destacan la pulpa de plátano y el agua de coco, debido al alto contenido de azúcares, aminoácidos, antioxidantes, minerales, ácidos orgánicos y agentes promotores del crecimiento que contienen [5]. Aumentando el porcentual de la sobrevivencia ex vitro [6]. En el presente trabajo se realizó la estandarización de protocolos de propagación in vitro de dos especies de orquídeas *Galeandra greenwoodiana* y *Sthanhopea hernandezii* como alternativa sustentable para su comercialización.

II. METODOLOGÍA

A. Material biológico

Se utilizaron capsulas dehiscentes de *Galeandra greenwoodiana* y *Sthanhopea hernandezii*. Estas capsulas fueron medidas con un vernier digital midiendo el largo y ancho, tomando evidencias fotográficas. Posteriormente se les realizó un corte longitudinal con un bisturí para extraer las semillas, tomando una muestra de estas con una microespátula, para realizar una preparación semi permanente con alcohol polivinilico (PVLG). Estas fueron observadas para registrar sus características, la presencia y tamaño del embrión evaluar el porcentaje de semillas, sin embrión (vanas), si presentaban alguna enfermedad. Las preparaciones fueron depositada en la colección del laboratorio de cultivo in vitro de la UIEM.

B. Potencial ornamental

Este potencial son los criterios con los que debe cumplir una orquídea para que sea de interés comercial, por lo tanto para *Galeandra greenwoodiana* y *Sthanhopea hernandezii* se usaron los siete criterios establecidos por Nava [7] donde se asignan valores de 1 si las características son aceptables y de cero si no presentan (Tabla I).

Tabla I. Número de criterios y niveles de calificación para determinar la potencialidad de especies Nava [7].

Número de criterios	Calificación
7	Excelente
6	Muy buena
5-4	Buena
3-2	Regular
1	Bajo
0	Nulo

De tal manera que la sumatoria representa el valor potencial y de acuerdo a las características que cumpla se consideran para cultivo, ejemplo de ello es que si reúnen los siete rasgos es una especie excelente para cultivar, al reducir los criterios (Tabla II) la posibilidad de que sean introducidas a un proceso productivo es menor.

Tabla II. Criterios de clasificación para determinar la potencialidad de las especies silvestres.

Número	Características	Criterios	Valores
1	Tamaño de la planta con inflorescencia	Plantas mayores a 50 cm. Planta menor a 50 cm	Aceptable No aceptable
2	Número y diámetro de las flores	Número de flores mayor a 5 y un diámetro mayor a 2.5 cm. Números de flores mayor a 5 y un diámetro menor a 2.5 cm. Números de flores menores a 5 y un diámetro mayor a 10 cm. Número de flores menores a 5 y un diámetro menor a 10 cm.	Aceptable No aceptable Aceptable No aceptable
3	Vistosidad de la flor	Tricolores o bicolores Un solo color	Aceptable No aceptable
4	Fragancia de la flor	Presente Ausente	Aceptable No aceptable
5	Periodo de floración	Floración mayor a 1 ½ mes Floración menor a 1 mes	Aceptable No aceptable
6	Rareza NOM-059-2010	Amenazada No amenazada	Aceptable No aceptable
7	Cultivada localmente o en catálogo de ventas	Si No	Aceptable No aceptable

C. Pruebas de germinación

Estas se realizaron para verificar su viabilidad y/o dormancia se usó, el medio de cultivo Murashige y Skoog [8] modificado por Suárez [9] (Msm), para el cultivo de orquídeas, este consiste en la reducción al 25 % de los macro nutrientes y al 50 % del resto de los componentes; excepto las vitaminas que se agregan en un 100 %, además de 0.5g/L de caseína, 30 g/L de sacarosa, 8.5g/L de agar bacteriológico. También se suplementó con 100 ml de agua de coco (C), o 100 ml de extracto de banana (B), y 1g/L de carbón activado; ajustando el pH a 5.5-5.75. El medio de cultivo se esterilizó en una autoclave durante 20 minutos a 115 libras de presión y a una temperatura de 121 °C. Los medios fueron colocados en cajas de Petri en alícuotas de 20 ml: a) Msm; b) Msm+ Banana y c) Msm + Coco. En esta fase se evaluó el porcentaje de germinación, considerando como semillas germinadas cuando el embrión adquirió humedad y rompió la testa. Para el conteo se usaron seis cajas petri por cada tratamiento, usando un acetato con cuadros de 1cm² en la base para contabilizar las semillas y se evaluó a los 30 días.

D. Propagación de las especies

Para la siembra de las semillas se utilizó el método de la jeringa el cual consistió en agregar aproximadamente 250 semillas de cada una de las especies con ayuda de una espátula de cuchara en una jeringa de 5 ml completamente estéril, la cual fue tapada en la parte inferior con un cubre bocas aséptico sujetándolo con una liga para evitar la pérdida de material biológico. Se realizó una solución de hipoclorito de calcio Ca (ClO)₂ al 7% para la desinfección de las semillas y se absorbieron aproximadamente 4 ml de este con la jeringa. Se agitó constantemente el contenido durante tres minutos,

se enjuagó tres veces con agua destilada durante tres minutos y se retiró el agua, dejando secas las semillas se golpeó la jeringa hasta formar una pastilla con las semillas; posteriormente la pastilla se colocó en una jeringa de diez ml estéril, se aforó con agua destilada y se agitó para suspender las semillas para su posterior siembra, los pasos anteriores se realizaron en una campana de flujo laminar.

Las semillas previamente desinfectadas se colocaron en medios de cultivo (Msm, Msm + Banana y Msm + Coco), con seis repeticiones obteniendo un total de 32 frascos que fueron puestos en cámara de incubación para su posterior observación a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, con un fotoperiodo de 16/8 h, humedad relativa de 47 % y la intensidad luminosa de 197 lux la cual fue proporcionada por lámparas fluorescentes (Luminaction®).

E. Subcultivos en medios de cultivo enriquecidos con citocininas

Se llevó a cabo en condiciones asépticas dentro de la campana de flujo laminar. Se tomaron los frascos de la planta madre de donde se extrajeron los protocormos más desarrollados con pinzas estériles colocándolas en cajas de Petri por tamaños para agruparlas y subcultivarlas en frascos con medio de cultivo nuevo, pero manteniendo el medio en donde germinaron, estos se sellaron herméticamente con egapack, etiquetándolos con el nombre de la especie, fecha y el medio usado. Se trasladaron al cuarto de cultivo bajo las condiciones antes descritas.

F. Establecimiento ex vitro

Se realizó en dos momentos en el primero se aclimataron plántulas propagadas sin hormonas y en el segundo plántulas propagadas con hormonas. Para ambos casos se siguió el siguiente procedimiento: las plántulas fueron extraídas de los frascos de cultivo para enjuagarlas en una solución de agua destilada con ocho gotas de plata ionizada al 0.35% (Microdyn) durante ocho minutos, retirándoles los restos del gelificante o medio de cultivo de las raíces, colocándolas en una caja de Petri para poder trasplantarlas. En esta etapa se evaluó el porcentaje de sobrevivencia en plántulas con hormonas, sin hormonas y por tratamiento usado.

III. RESULTADOS

En cuanto a la selección de las capsulas, se obtuvieron, una de *Galeandra greenwoodiana*, tres de *Stanhopea hernandezii*. Estas especies fueron caracterizadas obteniendo fotografías de su flor, además de presentar aromas agradables. También se midieron las cápsulas a lo largo y ancho, obteniendo para *Galeandra greenwoodiana* 33×11mm, y para *Stanhopea hernandezii* con 95×25 mm. Mientras que ambas especies presentaron semillas pequeñas con diferente ornamentación. La caracterización de cada una de las especies se muestra en la siguiente Figura 1; información obtenida por conversación directa con el Ing. Jesús Colín Rivera y recopilación bibliográfica.

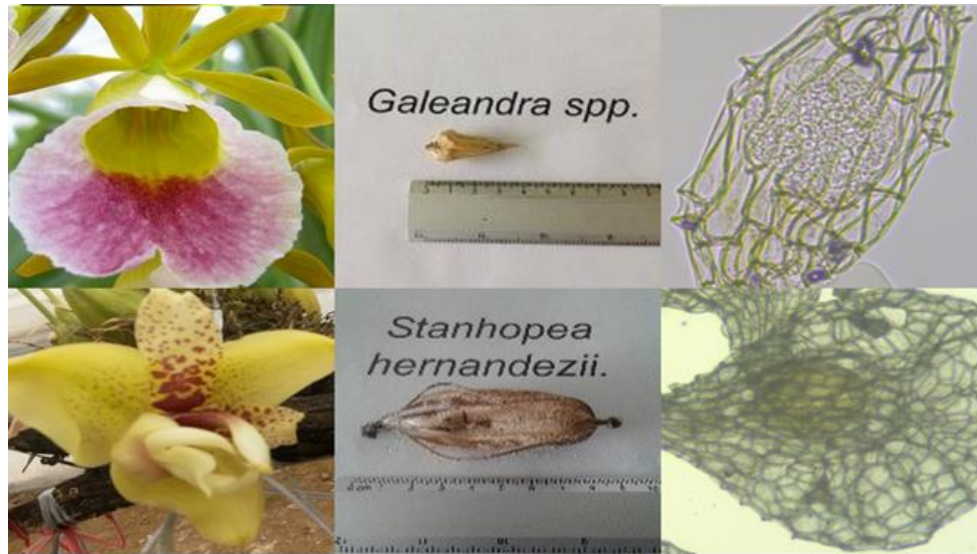


Fig. 1. Monografía de las especies de orquídeas de izquierda a derecha, flor, cápsulas, y semillas un aumento de 100x.

En cuanto el potencial ornamental se obtuvo que para *Galeandra greenwoodiana*. Cumple con cinco criterios de los cuales son: tamaño de la planta con inflorescencia, vistosidad de la flor, número de flores y diámetro de la flor, fragancia y la rareza, obteniendo un potencial ornamental bueno para su comercialización. Además *Stanhopea hernandezii*. Cumple con cinco criterios de los cuales son: tamaño de la planta con inflorescencia, vistosidad de la flor, número de flores y diámetro de la flor, fragancia y la rareza, obteniendo un potencial ornamental bueno para su comercialización (Tabla III).

Tabla III. Potencial ornamental de las especies bajo los criterios establecidas por Nava [7].

Características generales	Criterios	<i>Galeandra greenwoodiana</i>	<i>Stanhopea hernandezii</i>
Tamaño de la planta con inflorescencia	Plantas mayores a 50 cm. Planta menor a 50 cm	25-72 cm	20-50 cm
Núm. y diámetro de las flores	Núm. de flores mayor a 5 y un diámetro mayor a 2.5 cm. Núm. de flores mayor a 5 y un diámetro menor a 2.5 cm. Núm. de flores menores a 5 y un diámetro mayor a 10 cm. Núm. de flores menores a 5 y un diámetro menor a 10 cm.	3-5 flores con 2.0 cm de diámetro.	2 flores con un diámetro de 10 cm
Vistosidad de la flor	Tricolores o bicolores Un solo color	Más de tres colores	Más de tres colores
Fragancia de la flor	Presente Ausente	Presente	Presente
Periodo de floración	Floración mayor a 1 ½ mes Floración menor a 1 mes	8 días	5 días
Rareza NOM-059-2010	Amenazada No amenazada	Amnazada	Amenazada (IUCN.206)
Cultivada localmente o en catálogo de ventas	Si No	No	No
Número de criterios cumplidos		5	5

A. Pruebas y porcentaje de

La germinación se evaluó a los treinta días de siembra. Obteniendo un rango de número de semillas sembradas similar para ambas especies para *G. greenwoodiana* con un rango de 704 a 852 y para *S. hernandezii* de 786 a 926, cabe señalar que si bien la diferencia entre ambos rangos es de 82/26, esta diferencia no es significativa por el tamaño de las semillas. En cuanto a la efectividad de los medios de cultivo, los que presentan mayor porcentaje de germinación fueron los adicionados con compuestos orgánicos, en el medio testigo se presentó el 33.1 y 34 % lo que indica los menores porcentajes de germinación, mientras que el medio adicionado con banana estimulo más la germinación para *S. hernandezii* obteniendo 60.1 %, mientras que el medio adicionado con coco resultado más apropiado para la germinación de *G. greenwoodiana* con 51 % (Figura 2).

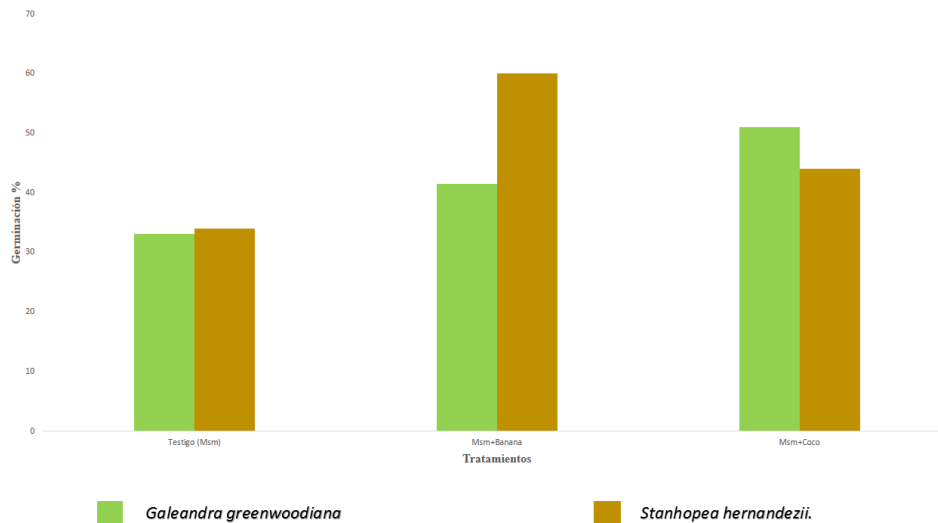


Fig. 2. Gráfica de porcentaje de germinación a los 30 días de cultivo de las especies.

Se obtuvieron porcentajes de germinación apenas superiores al 50 %, esto se debe a diferentes factores, algunos de ellos dependen de la misma semilla cuando el embrión no se encuentra (semillas vanas), la mayor parte de las especies de orquídeas presentan latencia misma que hay que romper o cada género e incluso especie requiere distintos nutrientes para su germinación y desarrollo. En algunos casos la germinación *in vitro* resulta ser lenta e ineficiente por lo cual se han propuesto distintas modificaciones para mejorar estos procesos, uno de ellos es la modificación del medio de cultivo Murashige y Skoog [8], adicionado con aditamentos orgánicos [10]. En este trabajo se apoya esta propuesta al encontrar mejores porcentajes de germinación en el medio adicionado con compuestos orgánicos. Estas condiciones deben ser consideradas para la propagación de ambas especies con fines comerciales, para que se obtenga mayor cantidad de material biológico y adicionar los medios de cultivo o aditamentos orgánicos.

Así, la conservación de las orquídeas y su aprovechamiento sustentable sigue siendo un reto, ya que cada especie requiere de condiciones específicas para su germinación y desarrollo. Precisamente un ejemplo de esto es que Moreno y Menchaca [6] reportaron un 90% de germinación a los 30 días de la siembra de *Stanhopea tigrina* Bateman, en medio Murashige y Skoog [8] enriquecido con aditamentos orgánicos como el agua de coco y el extracto de banana, porcentaje que no se logró en este trabajo para *Stanhopea hernandezii*, utilizando los mismos aditamentos en los que solo se alcanzó el 60.1 % con banana. En este trabajo se utilizó una modificación del medio MS propuesto por Suárez [9], en el que

ella obtuvo el 90% de germinación para *Euchile mariae*, mientras que en este trabajo solo se obtuvo en promedio el 33 % de germinación para ambas especies, o incluso la adición de carbón activado que también resulta estimular la germinación varia ampliamente por ejemplo Baltazar [11] obtuvo el 100% de germinación después de 30 días de la siembra de *Oncidium tigrinum*, usando el medio MS adicionado con carbón activado; mientras que en este trabajo no parece haber influido en el proceso de germinación.

Como ya se ha mencionado el proceso de germinación es complejo en la familia Orchidaceae, así como el proceso de desarrollo, este no se logró obtener para *S. hernandezii*, mientras que para *G. greenwoodiana* fue necesario adicionar citocininas en el medio para estimular su desarrollo y obtener plántulas.

B. Ontogenia (desarrollo de la especie) *Galeandra greenwoodiana*

La morfología de las orquídeas es propia de cada especie presentando diferencias desde la formación de cápsulas, la estructura de la semilla y el desarrollo de la semilla hasta llegar a ser plántula, debido a esto se llevó a cabo un registro fotográfico de los estadios de desarrollo de *G. greenwoodiana* que se muestra en la figura 3, tomando como base los estadios propuestos por Zettler y McInnis [12], cabe señalar que no se logró fotografiar el estadio 2 por lo que se utilizó la imagen generada por Zaragoza [13]. Así se estableció la evidencia de la ontogenia de *Galeandra greenwoodiana*. Para futuros trabajos interesados en su propagación para su manejo.

No.	Descripción	Ilustración
1.-	Semillas antes de germinar	
2.-	Imbibición del embrión y ruptura de testa.	
3.-	Protocormo con presencia de rizoides.	
4.-	Protocormo con primordio foliar.	
5.-	Aparición de la primera hoja.	
6.-	Alargamiento de la hoja y aparición de raíz.	
7.-	Plántula.	

Fig. 3. Ontogenia de *Galeandra greenwoodiana* basado en los estadios propuestos por Zettler y McInnis [12].

C. Propagación y aclimatación de la especie seleccionada

Se realizó la propagación de *Galeandra greenwoodiana* en el medio Msm y con los dos aditamentos orgánicos, donde se obtuvieron un total de 1 283 protocormos (Tabla IV). Estos fueron subcultivados en dos fases en la primera los más grandes se pasaron a frasco, para su individualización; sin embargo, se desarrollaban muy lentamente, obteniendo solo 12 plántulas; por lo que los frascos de medio para individualización, fueron adicionados con citocininas, condición que favoreció el desarrollo de los

protocormos. Se observó una respuesta diferente en cuanto al desarrollo en cada medio obteniendo los mejores resultados en el medio Msm en donde se obtuvieron 80 protocormos, el 52.5 % de estos llegaron a desarrollarse en plántulas, mientras que en el medio Msm + Banana se obtuvieron 535 protocormos solo el 8 % llegó a la etapa de plántula (Tabla IV). El medio Msm + Coco fue en el que se obtuvieron los mejores resultados en porcentaje de germinación y desarrollo ya que se obtuvieron 668 protocormos y de estos se obtuvieron 197 plántulas es decir el 29 %. En cuanto al número de hojas el medio Msm + Banana fue en donde se desarrollaron el mayor número de hojas, de 2 a 3, observándose la mayor vigorosidad un color verde más intenso, mientras que en los otros dos medios las plántulas fueron ligeramente más pequeñas.

Tabla IV. Número de protocormos obtenidos para la aclimatación.

Medio	Protocormos obtenidos	Protocormos subcultivados	Núm. de Plántulas	Núm. promedio de hojas
Testigo(Ms)	80	56	42	2
Msm+Banana	535	480	43	2 a 3
Msm+Coco	668	570	197	2
Total	1283	1106	282	

Para la aclimatación es decir la condición *ex vitro*, se le dio seguimiento a las plántulas obtenidas sin hormonas (12), de las cuales sobrevivieron el 58.3 % a 30 días *ex vitro* (Tabla V), Mientras que el efecto de las hormonas favoreció el desarrollo de las plántulas en el crecimiento y generación de raíces como se observa en la figura 4 donde en la parte superior se pueden observar las plántulas obtenidas con la adición de hormonas y en la parte inferior plántulas sin hormonas, además de favorecer el porcentaje de sobrevivencia a 79.8 %, aumentando un 21.5 % la sobrevivencia.

Tabla V. Número de plántulas y sobrevivencias de después de 30 días *ex vitro*.

Número de plántulas	Núm. de plántulas	Núm. de sobrevivientes	Porcentaje de sobrevivencia
Plántulas sin hormonas	12	7	58.3
Plántulas con hormonas	282	220	78



Fig. 4. Desarrollo de las plántulas de *Galeandra greenwoodiana* con y sin hormona.

En cuanto al porcentaje de sobrevivencia *ex vitro* de las plántulas obtenidas en cada medio el mejor medio sigue siendo Msm + Coco ya que además de obtener el mayor número de germinación y desarrollo también fue el medio con mayor porcentaje de sobrevivencia con un 79.6 % (Tabla VI), mientras que en los otros dos medios la respuesta fue muy similar.

Tabla VI. Número de plántulas y sobrevivencias después de 30 días *ex vitro*, en cada medio de cultivo.

Medio	Núm. de Plántulas	Núm. de plántulas sobrevivientes	Porcentaje de sobrevivencia
Testigo (Msm)	42	31	73.8
Msm+Banana	43	32	74.4
Msm+Coco	197	157	79.6

Así como los procesos de germinación y desarrollo presentan su dificultad, el paso más delicado en la propagación *in vitro* es la aclimatación, en la tabla VI se muestra el porcentaje de sobrevivencia el cual está relacionado directamente con los aditamentos orgánicos, los cuales ayudan a superar el cambio de medio hacia un sustrato. El medio con mayor porcentaje de sobrevivencia fue Msm + Coco con un 79.6% en comparación con Suárez [9], registró el 100 % de sobrevivencia para plántulas de *Euchile mariae* después de 35 días de haber sido transferidas en condiciones *ex vitro*, utilizando troncos de encino, troncos de tepozán más una mezcla de peat –moss y agrolita (proporción 3:1) colocadas sobre las raíces de plantas adventicias. Baltazar [11] registró aproximadamente un 100% de sobrevivencia para plántulas de *Oncidium tigrinum* Llave & Lex utilizando dos sustratos (tepezil y una mezcla de corteza de encino, tepezil y carbón vegetal en proporción 1:1:1). Siendo el tepezil el que presentó mayor porcentaje de sobrevivencia. Tinoco [14] registró un rango de sobrevivencia de 65-100 para *Epidendrum veroscriptum*, para *Laelia anceps* se registró un rango de sobrevivencia de 82.5 % hasta el 100 % usando como sustrato tepezil únicamente. Castañeda [15] registró aproximadamente el 100 % de sobrevivencia

de *Laelia anceps* después de dos meses de cultivo *ex vitro* utilizando la mezcla de corteza de pino, carbón vegetal y tepezil (1:1.1). Mientras en el presente trabajo se registró un promedio de 78 % de sobrevivencia para *Galeandra greenwoodiana* después de 30 días de haber sido transferidas a condiciones *ex vitro*, utilizando únicamente peat-moss. Si bien este porcentaje es menor, en comparación con el obtenido para otras especies es el primer registro de un protocolo completo de propagación para *Galeandra greenwoodiana*.

En cuanto al tiempo invertido para la obtención de plántulas susceptibles a ser comercializadas va de 8 a 6.4 meses como se muestra en la tabla VII, resaltando que la mayor parte del tiempo invertido fue en las primeras etapas de desarrollo, el cual se podría acortar al adicionar las hormonas desde el momento de la siembra ya que en el subcultivo solo se invirtió 35 días (Tabla VII). Se revisaron diferentes páginas de comercialización de orquídeas encontrando que *Galeandra greenwoodiana* es solicitada pero no se está propagando y pocas personas cuentan con material biológico. Se consultó al ingeniero Jesús Colín que considero que el precio estimado de venta de plántulas de 30 días *ex vitro* podría ser de 80 pesos, mientras que si se cuida en invernadero adecuadamente por un año estas alcanzan la madurez para florecer y el precio de venta podría ser de 250 a 300 pesos, además se podrían seleccionar los mejores ejemplares como plantas madre.

Tabla VII. Tiempo invertido en la obtención de plántulas susceptibles a comercializar de *Galeandra greenwoodiana*.

Medio	Tiempo de incubación	
Testigo Msm	177 días en incubación 35 días de subcultivo 30 días de aclimatación	242 días pasaron desde la germinación hasta aclimatación 8 meses para poder ser aprovechados comercialmente.
Msm+Banana	160 días en incubación 35 días de subcultivo 30 días de aclimatación	225 días pasaron desde la germinación hasta la aclimatación 7.5 meses para poder ser aprovechados comercialmente
Msm+Coco	128 días en incubación 35 días de subcultivo 30 días de aclimatación	193 días pasaron desde la germinación hasta la aclimatación 6.4 meses para poder ser aprovechados comercialmente

IV. CONCLUSIONES

El cultivo *in vitro* es una técnica adecuada para la germinación de especies de la familia Orchidacea; se logró obtener una capsula de *Galeandra greenwoodiana* y tres de *Stanhopea hernandezii*, las cuales fueron medidas, así como las semillas; además evaluó su potencial ornamental encontrando que ambas especies cuentan con un potencial ornamental bueno.

Con respecto a las pruebas de germinación se encontró que *Galeandra greenwoodiana* y *Stanhopea hernandezii* fueron capaces de germinar a los 30 días presentando un 51 % de germinación en Msm + Coco para *G.greenwoodiana* y 60.1 % en Msm + Banana para *S.hernandezii*. La propagación *in vitro* de estas especies fue viable al obtener 1283 protocormos en total para *G.greenwoodiana*. Además, se registró fotográficamente el proceso ontogénico de esta especie, siendo un aporte importante debido a que cada género e inclusive especie presentan diferentes etapas de desarrollo, además que en los trabajos realizados acerca de orquídeas, pocas veces se evidencia el proceso de desarrollo de las especies propagadas.

En el subcultivo se lograron obtener en una primera etapa 12 plántulas y en la segunda etapa donde los medios fueron enriquecidos con citocininas se obtuvieron 282 plántulas en un menor tiempo. Siendo Msm + Coco del que se obtuvieron mayor cantidad de plántulas con 197. En total se obtuvieron 284

plántulas en un periodo de 6.4 a 8 meses. En la aclimatación *ex vitro* el porcentual de sobrevivencia resulto mejor en las plántulas que se obtuvieron de medios enriquecidos con hormonas al presentar un 78% a diferencia del 58.3% mostrado por medios de cultivo sin hormonas, siendo Msm + Coco el que presento mejor desarrollo de plántulas y mayor sobrevivencia con un 79.6 %.

En el presente trabajo se logró establecer un protocolo de propagación para la comercialización de *Galeandra greenwoodiana*, determinando que Msm + Coco es el mejor medio para el cultivo. Además, que la adición de hormonas (Kinetin y Benzimetalopurina) potencia el crecimiento y desarrollo de esta especie, lo que nos permite reducir el tiempo para obtener plántulas susceptibles para la comercialización a diferencia del tiempo que tardaríamos en obtenerlas si solo se usara el medio de cultivo enriquecido con aditamentos orgánico.

REFERENCIAS

- [1] Suarez, I., & Chavez, V. (2007). Propagación in vitro y aclimatización de *Euchile mariae* (ames) withner(Orchidace). Lankasteriana, 388-393.
- [2] Tellez, M., (2012). La importancia de la conservacion ex situ ,un ejemplo: la coleccion de orquideas del Jardin Botanico del Instituto de Biologia de la Universidad Nacional Autónoma de México. En: M. Tellez, ed. Conservación de orquideas en México. México: Ideograma, pp. 79-87.
- [3] Avila, I., & Salgado, R. (2006). Propagación y mantenimiento in vitro de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. Rev. Biológicas, Fac. Biol. Univ. Michoacana Sn Nicolás de Hgo. 8:138-149..
- [4] SEMARNAT. (2010). Nom-059-Semarnat-2010. México. Recuperado el 17 de 11 de 16, de <http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/agenda/DOFsr/DO2454.pdf>
- [5] Ardiiti, J & R. Ernest. (1993). Micropropagation of orchids. Wiley-Interscience Publication. New York. 682 p.
- [6] Moreno, D., & Menchaca, R. (2007). Efecto de los compuestos organicos en la propagación in vitro de *Stanhopea tigrina* bateman. Foresta veracruzana, 9(2), 27-32.
- [7] Nava, J. (2008).las orquídeas del municipio de Ocuilan de Arteaga, Estado de México. (Tesis de licenciatura).Universidad Autónoma del Estado de México. México.
- [8] Murashige, T. y Skoog, F. 1962, A. revised médium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:447-497
- [9] Suarez, I. (2006). Regeneración in vitro de *Euchile mariae* (Ames) Withner, (orchidaceae), especie endémica de México. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- [10] Kerbauy, G. B. (1991). In vitro conversion of *Cattleya* root tip cells into protocorm-like bodies. *J. Plant Physiol.* 138: 248-251
- [11] Baltazar, R. (2004). Micropropagación de *Oncidium tigrinum* Llave & Lex. (Orchidaceae) a partir de protocormos. (Tesis de licenciatura).Universidad Veracruzana. México.
- [12] Zettler,L.W y T.M. McInnis. (1993). Symbiotic germination and development of *Spirantes cernua* and *Goodyera pubescens* (Orchidaceae:Spiranthoideae). *Lindleyana* 8: 155-162.
- [13] Zaragoza, N. (2013).Efecto de extractos de origen fúngico en la germinación asimbiótica in vitro de *Guarianthe aurantiaca* (Bateman ex Lindl.) Dressler et W. E. Higgins y *Euchile mariae* (Ames) Withner x *Euchile citrina* (La Llave et Lexarza) Withner (Orchidaceae).
- [14] Tinoco, M. (2006). Adquisición de competencia para la micropropagación de *Stanhopea tigrina*, *Laelia anceps*, *Epidendrum veroscriptum* y *Cattleya x esbetts*
- [15] Castañeda, M. (2008).Propagación y conservación de Lirio de Todos los Santos *Laelia anceps* Lindl. subsp. *anceps* f. *semialba* (Orchidaceae) a través del Cultivo de Tejidos.