



EVALUACIÓN DEL ÁCIDO SALICÍLICO EN LA ACLIMATACIÓN *ex vitro* DE MICROPLANTAS DE *Laelia autumnalis* (Lex.) Lind., *Epidendrum* sp. Y *Encyclia* sp. †

[EVALUATION OF SALICYLIC ACID IN THE *ex vitro* ACCLIMATATION OF MICROPLANTS OF *Laelia autumnalis* (Lex.) Lind., *Epidendrum* sp. AND *Encyclia* sp.]

Martha Elena Mora-Herrera^{1*}, Juan Manuel Olivares-Aguilar¹,
Diana Yatzil Reyes-Araujo², Stephanie Elizabeth Ceballos-Vásquez¹
and Rómulo García-Velasco¹

¹Centro Universitario Tenancingo Universidad Autónoma del Estado de México.
Carretera. Tenancingo-Villa Guerrero Km 1.5 Estado de México, C.P. 52400,
México. Email: marthaelenam@gmail.com *, manyflo13@gmail.com,
sceballosvasquez@gmail.com, romogv71@gmail.com.

²Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Carretera México-Texcoco Km
36.5. Texcoco, Estado de México, 56230, México. Email reyes.diana@colpos.mx

*Corresponding author

SUMMARY

Background: One of the main problems of *in vitro* propagation of orchids is the loss of specimens during acclimatization. This stage is crucial to promote morphological and physiological changes that allow their adaptation to *ex vitro* conditions. Salicylic acid (SA), by participating as a signal molecule for the induction of tolerance to abiotic and biotic stress and stimulating growth, can increase survival. **Objective:** The objective of this work was to evaluate the effect of salicylic acid on the *ex vitro* acclimatization of microplants of *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp., and *Encyclia* sp. **Methodology:** The experiments started from a permanent source of biological material from microplants of *L. autumnalis*, *Epidendrum* sp., and *Encyclia* sp., grown in Murashige-Skoog (MS) medium. For the treatments, microplants between 0.5 and 0.7 mm were subcultured to MS by adding 0, 1, 10 or 100 µM of AS for 120 ± 4 days under *in vitro* conditions. At the end of that time, the length of the stem and root, and the fresh weight of the microplants of the 3 species, were evaluated. The plants were subsequently transplanted into seedbeds with pine bark and sphagnum moss and watered twice a week and kept in a growth chamber at room temperature for acclimatization; after 30 days survival was evaluated. **Results:** Microplants precultured in AS showed differential response in the evaluated variables. Stem and root length and fresh weight increased in *Epidendrum* sp., and *Encyclia* sp., especially in the 10 µM treatment, while *L. autumnalis* showed inhibition in stem and root length and there was only an increase in fresh weight. The microplants of the 3 species precultured with 10 µM of AS significantly increased survival compared to the control. In *L. autumnalis* and *Epidendrum* sp., there was also an increase in survival in the preculture of 1 µM of AS and for *Encyclia* sp. in 100 µM of AS. **Implications.** Although AS has potential for *ex vitro* acclimatization of orchids, the variability in response between species should be considered and natural conditions for acclimatization should also be evaluated, with a view to contributing to repopulating orchid communities in their natural environment. **Conclusion:** AS increases survival under *ex vitro* conditions, and growth differentially in orchid microplants.

Key words: Signal molecule; *in vitro* culture; biodiversity; abiotic stress.

RESUMEN

Antecedentes: Uno de los principales problemas de la propagación *in vitro* de orquídeas, es la pérdida de ejemplares durante la aclimatación, esta etapa es crucial para promover los cambios morfológicos y fisiológicos que permitan su adaptación a condiciones *ex vitro*. El ácido salicílico (AS) al participar como molécula señal para la inducción de tolerancia a estrés abiótico y biótico y estimular el crecimiento puede incrementar la supervivencia. **Objetivo:** El

† Submitted December 1, 2023 – Accepted September 11, 2024. <http://doi.org/10.56369/tsaes.5301>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462.

ORCID = M.E. Mora-Herrera: <https://orcid.org/0000-0003-1362-7956> R. Garcia-Velasco: <https://orcid.org/0000-0001-7409-8766> D.Y. Reyes-Araujo: <https://orcid.org/0009-0001-1315-2105> J.M. Olivares-Aguilar: <https://orcid.org/0009-0000-2897-7786> S.E. Ceballos-Vásquez: <https://orcid.org/0009-0004-6651-9961>

objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del ácido salicílico en la aclimatación *ex vitro* de microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp., y *Encyclia* sp. **Metodología:** Los experimentos partieron de una fuente permanente de material biológico de microplantas de *L. autumnalis*, *Epidendrum* sp., y *Encyclia* sp., cultivadas en medio Murashige-Skoog (MS). Para los tratamientos, microplantas de entre 0.5 y 0.7 mm se subcultivaron a MS adicionando con 0, 1, 10 o 100 μM de AS durante 120 ± 4 días en condiciones *in vitro*. Concluido ese tiempo se evaluó la longitud del tallo y la raíz, y el peso fresco de las microplantas de las 3 especies. Posteriormente las plantas se trasplantaron a almácigos cuyo sustrato fue corteza de pino y musgo sphagnum y se regaron 2 veces por semana, y se mantuvieron en una cámara de crecimiento a temperatura ambiente para la aclimatación; después de 30 días se evaluó la supervivencia. **Resultados:** Las microplantas precultivadas en AS mostraron respuesta diferencial en las variables evaluadas. La longitud del tallo y de la raíz y el peso fresco incrementaron en *Epidendrum* sp., y *Encyclia* sp. especialmente en el tratamiento 10 μM mientras que en *L. autumnalis* presentó inhibición en la longitud del tallo y raíz y solo hubo incremento en el peso fresco. Las microplantas de las 3 especies precultivadas 10 μM de AS incrementaron significativamente la supervivencia con respecto al testigo. En *L. autumnalis* y *Epidendrum* sp., además hubo incremento en la supervivencia en el precultivo de 1 μM de AS y para *Encyclia* sp. en 100 μM de AS. **Implicaciones.** Aunque AS tiene potencial en la aclimatación *ex vitro* de orquídeas se debe considerar la variabilidad en la respuesta entre especies y además evaluar condiciones naturales para la aclimatación, con miras a contribuir a repoblar comunidades de orquídeas en su entorno natural. **Conclusión:** El AS incrementa la supervivencia a condiciones *ex vitro*, y el crecimiento de forma diferencial en microplantas de orquídeas. **Palabras clave:** Molécula señal; cultivo *in vitro*; biodiversidad; estrés abiótico.

INTRODUCCIÓN

En México existen aproximadamente 1,260 especies de orquídeas, agrupadas en 168 géneros (Soto-Arenas *et al.*, 2007). Las orquídeas, se ubican entre las plantas más vulnerables, debido a la sobreexplotación del medio silvestre, tráfico ilegal, pérdida de hábitat y cambio climático (Tejeda-Sartorius *et al.*, 2018, Soto *et al.*, 2021); además, algunos países desarrollados demandan orquídeas silvestres a los países con mayor riqueza de estas plantas (Swarts y Dixon, 2009); lo que ha provocado que algunas especies se encuentren en peligro de extinción y estén incluidas en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010). Por lo que urgen medidas para la conservación de la biodiversidad que de acuerdo con la CONABIO (2022), es la variedad de la vida; que incluye los niveles de organización biológica que se encuentran en los todos los ecosistemas.

Brush (1995), definió que el termino conservación implica el manejo, preservación y uso de recursos genéticos, y se pueden dividir en dos métodos fundamentales: 1) la conservación *in situ*; que, significa conservar en el lugar de origen de la especie; y la 2) conservación *ex situ*, que, de acuerdo con Menchaca-García y Moreno-Martínez (2011), se define como la conservación fuera del lugar de colecta; y esto es la forma básica de los bancos de germoplasma. En los últimos años, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y otras instituciones educativas y de investigación, han trabajado por la conservación *in situ*, ya que este método de conservación tiene la finalidad de conservar la riqueza genética local (Camacho-Villa *et al.*, 2024).

Por otro lado, muchas especies de orquídeas como *Laelia autumnalis*, tiene una baja tasa de propagación y lento crecimiento en condiciones naturales, esto debido a que sus semillas son carentes de endospermo y poseen baja capacidad de germinación, además necesitan de una asociación obligatoria con micorrizas (Harris *et al.*, 2021). Esta asociación suele ser muy específica y muchas semillas germinan en presencia de un hongo en particular que dependerá de la orquídea y el hábitat de donde provenga (Novak *et al.*, 2014).

Por esto, el proceso de germinación asimbiótica se utiliza como método básico de producción de plantas a gran escala (Salazar-Mercado, 2012). Uno de los métodos asimbióticos es la micropropagación, que puede tener distintos objetivos como son: producción de nuevas variedades, conservación *ex situ* y reintroducción de especies a ambientes naturales (Sánchez-Sotomayor *et al.*, 2021). Las desventajas de este método son el tiempo que lleva hasta la obtención de ejemplares adultos que va de 3 a 5 años (Zeng *et al.*, 2016).

Desde hace algunas décadas, el cultivo *in vitro* de plantas es una técnica, que ha demostrado su utilidad en la propagación de especies amenazadas, porque ofrece la posibilidad de multiplicar plantas, especies, e híbridos de orquídeas a escalas mayores que las obtenidas a través de los procedimientos tradicionales (Campos *et al.*, 2020, Podwyszyńska *et al.*, 2022).

Para una adecuada aclimatación *ex vitro* de las plantas que provienen de cultivo *in vitro*, se requiere de condiciones muy especiales para prevenir su muerte, ya que los cambios de ambiente a los que se enfrentan después de mantenerse en un ambiente aséptico y controlado son muy drásticos (Silva *et al.*, 2017). La transferencia debe realizarse de forma gradual; durante

esta etapa se produce un retorno progresivo al funcionamiento autotrófico de las microplantas, así como la recuperación de las características morfológicas y fisiológicas normales; y el obtener microplantas bien desarrolladas y vigorosas, favorecerá un mayor porcentaje de supervivencia a la aclimatación. Existe información de que algunas moléculas señal como el ácido salicílico intervienen en los procesos de aclimatación de plantas a condiciones adversas incluida la aclimatación (Poot-Poot *et al.*, 2018, Cruz y Mora-Herrera, 2018).

El ácido salicílico (AS) es un compuesto fenólico constituyente natural de las plantas (Mady, 2009), que ha sido ampliamente estudiado por su función como señalizador endógeno que media las respuestas locales y sistémicas contra patógenos (estrés biótico); y durante las respuestas a estrés abiótico, como sequía, frío, toxicidad por metales pesados, calor, estrés osmótico (Larqué-Saavedra y Martín-Mex, 2007), frío (Mora-Herrera *et al.*, 2005) entre otros, además Khan *et al.* (2014), describen al AS como regulador de diversos procesos metabólicos en las plantas que además, modula la producción de diversos osmolitos y metabolitos secundarios, por ello, el AS desempeña una función crucial en la regulación de factores fisiológicos y procesos bioquímicos durante todo el ciclo de las plantas (Rivas-San Vicente y Plascencia, 2011).

Existen pocos estudios del efecto del AS en orquídeas, pero se ha reportado una disminución significativa de la oxidación de explantes de hoja de *Laelia autumnalis*, y la inducción de organogénesis directa de explantes de hoja de la misma especie provenientes de microplantas precultivadas en AS en procesos morfogénicos (Hernández-Bello y Mora-Herrera, 2021).

Por esto, el objetivo de este estudio es evaluar el efecto del ácido salicílico en la aclimatación *ex vitro* de microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp., y *Encyclia* sp.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio experimental

Esta investigación se realizó entre los años 2018-2019 en el Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal, del Centro Universitario UAEM Tenancingo, en Tenancingo de Degollado, Estado de México, México. Coordenadas geográficas 18°58'6.05" norte $\pm$ 35 m y 99°36'48.2" oeste $\pm$ 35 m, a 2,053 msnm.

Material Vegetal

Se utilizaron microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp., y *Encyclia* sp., del banco de

germoplasma del Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal, del Centro Universitario UAEM Tenancingo. Todos los tratamientos iniciaron a partir de microplantas de *L. autumnalis*, *Epidendrum* sp., y *Encyclia* sp., cultivadas en medio MS (Murashige y Skoog, 1962, con modificaciones de Espinoza *et al.*, 1986); y se mantuvieron en una cámara de incubación a una temperatura de 20 ± 1 °C, con un fotoperiodo de 16 horas y una intensidad lumínica de entre 400-700 nm.

Incubaciones *in vitro* con ácido salicílico

Microplantas de *L. autumnalis*, *Epidendrum* sp., y *Encyclia* sp., de entre 0.5 a 0.7 cm se subcultivaron en medio básico MS en concentraciones de 0 (testigo), 1, 10 o 100 μ M de AS durante 120 ± 4 días.

Evaluación del crecimiento y desarrollo

Con el objetivo de determinar el efecto del ácido salicílico en el crecimiento de las microplantas de orquídeas estudiadas, se cuantificaron las variables; longitud de tallo y raíz y peso fresco.

Las plantas de *L. autumnalis*, *Epidendrum* sp., y *Encyclia* sp., provenientes de condiciones *in vitro* precultivadas en AS, se enjuagaron perfectamente y se colocaron en papel absorbente, una vez secas se evaluó la longitud del tallo, y raíz con un vernier, así como el peso fresco de cada planta. Posteriormente se sembraron en almácigos de 15 x 26 cm con cavidades de 20 x 35 mm con sustrato de corteza de pino y musgo Sphagnum en una proporción 2:1 esterilizado e hidratado. Las plantas se regaron dos veces por semana con agua a un pH entre 5.6 - 5.7 ajustada con KOH.

Estos cultivos, se mantuvieron en una cámara de crecimiento a una temperatura de 21 ± 2 °C de día y 17 ± 2 °C de noche con un fotoperiodo de 16 horas y una intensidad lumínica de entre 400-700 nm para su aclimatación *ex vitro*, 30 $\pm$ 2 días después se evaluó la supervivencia.

Evaluación de la supervivencia

Con el objetivo de conocer el efecto del ácido en la adaptación a condiciones *ex vitro* de las microplantas de orquídeas, una vez concluido el tiempo de condiciones *ex vitro*, se cuantificaron las plantas vivas considerando en: *Epidendrum* sp., al menos una hoja en desarrollo y verde; y en *L. autumnalis* y *Encyclia* sp., al menos un pseudobulbo verde.

Diseño experimental

Cada tratamiento se dispuso en un diseño completamente aleatorio; una planta se consideró una unidad experimental con 30 microplantas por

tratamiento. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza ANOVA y la prueba de rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Crecimiento

Para la evaluación del crecimiento se cuantificó la longitud del tallo y de la raíz, y el peso fresco de microplantas de *L. autumnalis*, *Epidendrum* sp., y *Encyclia* sp., cultivadas en medio MS con AS durante 120 días, obteniéndose los siguientes resultados:

Laelia autumnalis

En las microplantas de *Laelia autumnalis*, precultivadas en los tratamientos 1, 10 y 100 μM de AS, el crecimiento del tallo fue menor en un 35, 14 y 39 % respectivamente con relación al control (Tabla 1). En el caso de la raíz, no se observaron diferencias significativas en los tratamientos precultivados en 1 y 10 μM de AS, sin embargo, en el tratamiento 100 μM de AS se observó una inhibición del crecimiento significativa de hasta 40 % con respecto al control (Tabla 2). En cuanto al peso fresco, las microplantas precultivadas en todas las concentraciones de AS, incrementaron significativamente específicamente hasta un 70 % en el precultivo de 10 μM de AS respecto al control (Tabla 3).

Epidendrum sp.

Las microplantas de *Epidendrum* sp. precultivadas en la concentración de 10 y 100 μM de AS, mostraron una tendencia al incremento de la longitud del tallo de hasta 22 y 16 %, respectivamente con referencia al control; por el contrario, el tratamiento 1 μM de AS redujo hasta un 10 % (Tabla 1). En la longitud de la raíz, ningún tratamiento indujo cambios significativos con respecto al control; pero se observa una tendencia al incremento respecto al control, siendo del 20 y 27 % respectivamente para los tratamientos 10 y 100 μM de AS (Tabla 2). En el peso fresco de las microplantas precultivadas en 10 y 100 μM de AS, se observó un incremento en los tratamientos en un 40 y 45.4 % respectivamente; mientras que el tratamiento 1 μM de AS, presentó un decremento, aunque no significativo respecto al control del 13 % (Tabla 3).

Encyclia sp.

Las microplantas de *Encyclia* sp. presentaron una tendencia al incremento en la longitud del tallo, aunque, únicamente las precultivadas en el tratamiento 10 μM de AS fue significativo con un 23.6 % respecto al testigo (Tabla 1); en relación con la longitud de la raíz, el tratamiento 1 μM de AS incrementó significativamente en un 65 %, mientras que el

tratamiento 100 μM hubo un decremento en un 33 % respecto al control (Tabla 2). El peso fresco de las microplantas precultivadas en los tratamientos de 1 y 10 μM de AS incremento significativamente en un 16 y 13 % respectivamente; mientras que en el tratamiento de 100 μM de AS, no presentó diferencias respecto al testigo (Tabla 3).

Supervivencia

Ningún tratamiento de AS fue letal para el desarrollo de las orquídeas de este estudio en condiciones *in vitro*.

L. autumnalis

Las microplantas de *L. autumnalis* precultivadas en los tratamientos 1 y 10 μM de AS, incrementaron significativamente la supervivencia a condiciones *ex vitro* en un 60 y 110 % respectivamente con referencia al control; mientras que las plantas del tratamiento 100 μM de AS no presentaron diferencias significativas, aunque tuvo 10 % más de supervivencia (Figura 1).

Epidendrum sp.

Las microplantas de *Epidendrum* sp. precultivadas en los tratamientos de 1 y 10 μM de AS incrementaron significativamente la supervivencia a condiciones *ex vitro* en un 46 y 69 % respectivamente con referencia al testigo. Las plantas del tratamiento 100 μM no tuvieron diferencia significativa (Figura 2).

Encyclia sp.

Las microplantas de *Encyclia* sp. precultivadas en los tratamientos de 10 y 100 μM de AS incrementaron significativamente la supervivencia a condiciones *ex vitro* en un 80 y 40 % respectivamente con referencia al control (Figura 3); mientras que las plantas del tratamiento 1 μM de AS no mostraron diferencias estadísticas, aunque se observó un incremento del 10 %.

DISCUSIÓN

Actualmente existen investigaciones que demuestran la importancia de la biotecnología, especialmente el cultivo *in vitro* en la propagación y conservación de especies vegetales amenazadas o en alguna categoría de riesgo, como es el caso de la familia de las orquídeas. Esto, porque ofrece la posibilidad de germinar y multiplicar más plantas a gran escala que las obtenidas a través de procesos naturales o convencionales (Lee y Lee, 2003, Shimura y Koda, 2004, Espinosa-Reyes *et al.*, 2019). Sin embargo, uno de los principales problemas de estas tecnologías, es la baja supervivencia que se obtiene al trasplante a condiciones *ex vitro*, debido a factores de estrés biótico y abiótico que disminuyen las probabilidades de

aclimatación y por lo tanto de supervivencia (Silva *et al.*, 2017) especialmente en las orquídeas. Otra característica que no permite el óptimo establecimiento de las orquídeas a condiciones *ex vitro* es, el lento desarrollo y crecimiento que presentan (Sánchez-Sotomayor *et al.*, 2021).

El ácido salicílico es una molécula señal que ha demostrado inducir tolerancia a factores de estrés biótico y abiótico y además participar en el desarrollo y crecimiento de las plantas (Khan *et al.*, 2014, Peng *et al.*, 2021), por lo que fue probado en esta investigación para el establecimiento de microplantas de 3 especies de orquídeas a condiciones *ex vitro*.

En general, el crecimiento de microplantas de orquídeas precultivadas en AS, al establecerse a un ambiente *ex vitro*, tuvieron una respuesta diferencial dependiente de la especie y de la concentración de AS en la que fueron precultivadas. Así se encontró incremento o inhibición del crecimiento con respecto al control (Tabla 1, 2 y 3). Estas respuestas diferenciales básicamente están definidas por las características genéticas que se ven dirigidas por el medio ambiente (Sommer, 2020), así es cómo en algunos casos el ácido salicílico induce crecimiento y

en algunos casos lo inhibe (Peng, 2021), inclusive siendo la misma concentración, y en este caso son diferentes especies.

Se ha confirmado el efecto exógeno del AS en el crecimiento de las plantas, por ejemplo, con el uso de concentraciones micro o milimolares de AS incrementó del peso fresco de plántulas de trigo (Tucuch-Haas *et al.*, 2017), tomate (Larqué-Saavedra *et al.*, 2010), así como el incremento del peso fresco medido específicamente en raíz de jitomate (Poot-Poot *et al.*, 2018) y yuca (Gómez-Llaca, 2015). De igual manera Khodary (2004), reporto un incremento del peso fresco en tallo y raíz de plántulas de maíz usando una concentración de 10^{-2} M de AS, a pesar de que esta concentración es muy alta y en otras especies puede ser letal. Esto demuestra que cada especie va a responder diferencialmente a la concentración de AS, En algunos casos se ha reportado la inhibición del crecimiento por efecto del ácido salicílico, como por ejemplo en microplantas de papa (Mora-Herrera *et al.*, 2025), lo que indica que la aplicación exógena de SA tiene diversos efectos sobre el crecimiento y el desarrollo dependiendo de la especie de planta, la etapa de

Tabla 1. Longitud (mm) del tallo de microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp., y *Encyclia* sp., precultivadas por 120 ± 4 días en AS.

Concentración de AS	<i>Laelia autumnalis</i>	<i>Epidendrum</i> sp.	<i>Encyclia</i> sp.
0 μ M	12.15 ± 0.067^B	16.46 ± 0.089^{AB}	12.18 ± 0.76^A
1 μ M	7.90 ± 0.068^A	14.89 ± 0.0801^A	14.13 ± 0.76^{AB}
10 μ M	10.46 ± 0.058^B	20.11 ± 0.105^B	15.06 ± 0.76^B
100 μ M	7.36 ± 0.0803^A	19.13 ± 0.107^{AB}	13.96 ± 0.76^{AB}

Valores con la misma letra son estadísticamente similares, prueba ANOVA Duncan ($p < 0.05$). Los datos son expresados por promedios $\pm$ error estándar.

Tabla 2. Longitud (mm) de la raíz de microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp., y *Encyclia* sp., precultivadas por 120 ± 4 días en AS.

Concentración de AS	<i>Laelia autumnalis</i>	<i>Epidendrum</i> sp.	<i>Encyclia</i> sp.
0 μ M	6.7 ± 0.047^B	14.2 ± 0.096^A	14.5 ± 1.1^B
1 μ M	6.3 ± 0.049^B	14.7 ± 0.101^A	24.1 ± 1.1^C
10 μ M	7.5 ± 0.052^B	17.2 ± 0.103^A	16.4 ± 1.1^B
100 μ M	4.0 ± 0.061^A	18.2 ± 0.112^A	9.7 ± 1.1^A

Valores con la misma letra son estadísticamente similares, prueba ANOVA Duncan ($p < 0.05$). Los datos son expresados por promedios $\pm$ error estándar.

Tabla 3. Peso fresco (g) de microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp., y *Encyclia* sp., precultivadas por 120 ± 4 días en AS.

Concentración de AS	<i>Laelia autumnalis</i>	<i>Epidendrum</i> sp.	<i>Encyclia</i> sp.
0 μ M	46.6 ± 0.16^B	94.8 ± 0.22^{AB}	132.4 ± 5.9^B
1 μ M	76.7 ± 0.24^A	82.1 ± 0.24^B	154.6 ± 5.9^A
10 μ M	79.7 ± 0.38^A	133.6 ± 0.38^A	150.8 ± 5.9^A
100 μ M	70.4 ± 0.30^A	137.9 ± 0.20^A	125.4 ± 5.9^B

Valores con la misma letra son estadísticamente similares, prueba ANOVA Duncan ($p < 0.05$). Los datos son expresados por promedios $\pm$ error estándar.

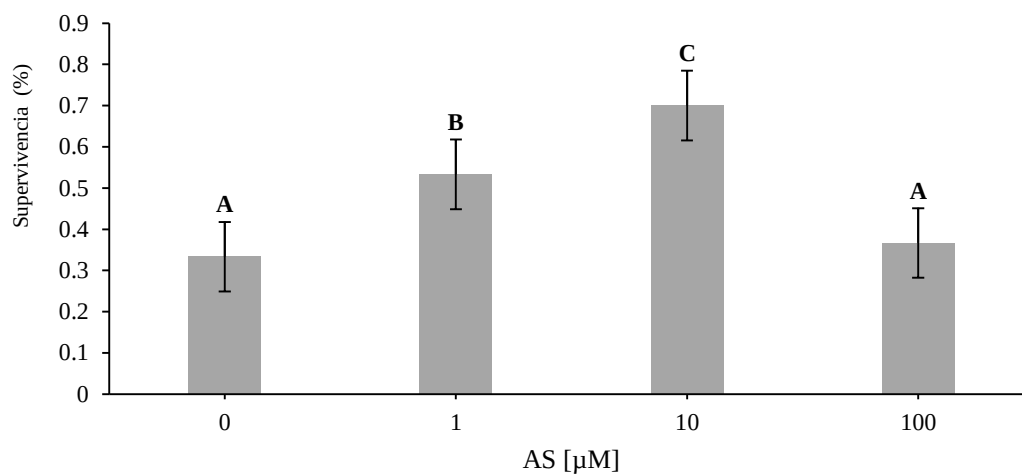


Figura 1. Supervivencia de microplantas de *Laelia autumnalis*, precultivadas 120 días en AS y trasplantadas a sustrato por 30 días. Valores con la misma letra son estadísticamente similares, prueba ANOVA Duncan ($p < 0.05$).

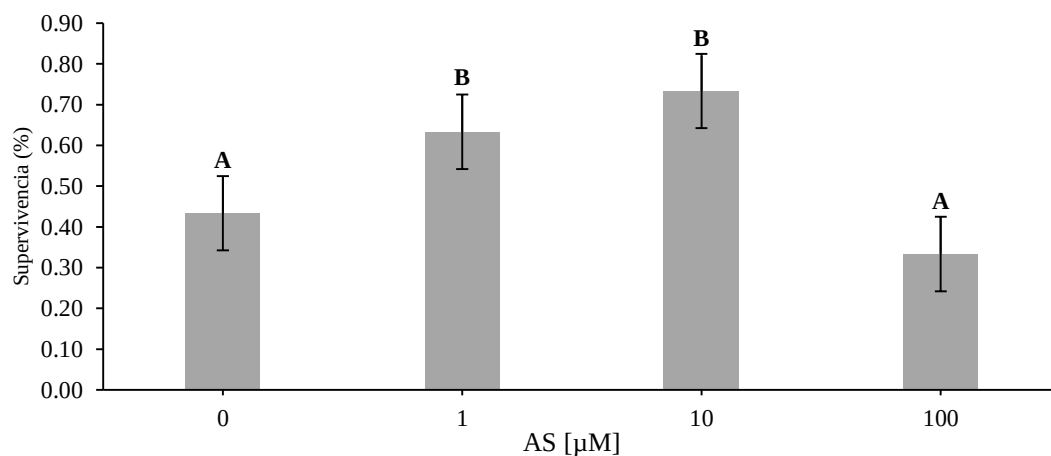


Figura 2. Supervivencia de microplantas de *Epidendrum* sp., precultivadas 120 días en AS y trasplantadas a sustrato por 30 días. Valores con la misma letra son estadísticamente similares, prueba ANOVA Duncan ($p < 0.05$).

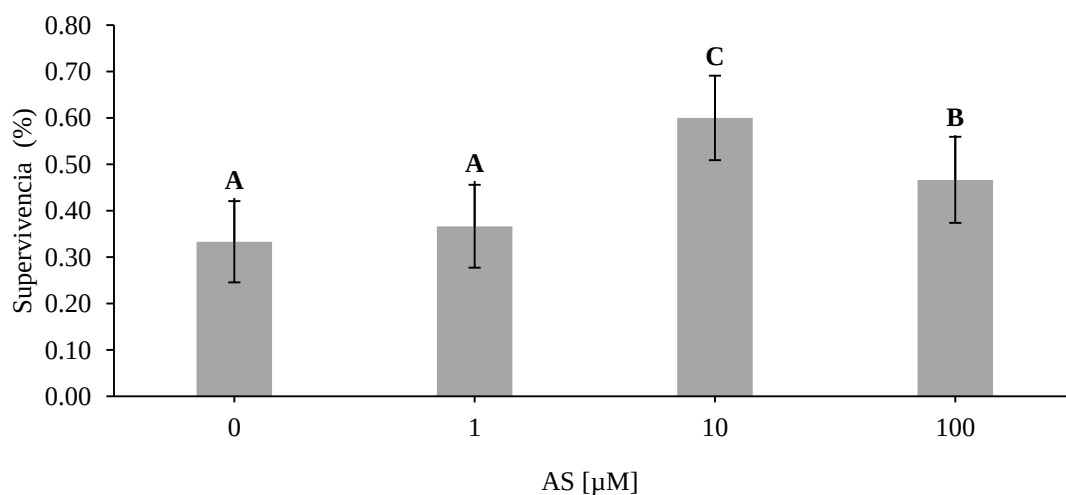


Figura 3. Supervivencia de microplantas de *Encyclia* sp., precultivadas 120 días en AS y trasplantadas a sustrato por 30 días. Valores con la misma letra son estadísticamente similares, prueba ANOVA Duncan ($p < 0.05$).

desarrollo y la concentración de SA utilizada (Rivas-San Vicente y Plasencia 2011, Peng, 2021). Es importante destacar que la inhibición del crecimiento inducida por el AS en las microplantas de papa estuvo asociada al incremento de supervivencia y aclimatación a temperaturas bajas (Mora-Herrera *et al.*, 2025).

Fundamentalmente las raíces son una de las estructuras importante para las orquídeas epifitas ya que no solo son el soporte, sino también absorben los nutrientes, además, de mantener gran cantidad de humedad y tener actividad fotosintética, en general las microplantas precultivadas con 10 μM de AS mostraron incremento en el crecimiento de las raíces, destacando por ejemplo que para *Encyclia* sp. hubo mayor incremento en el tratamiento 1 μM de AS, lo que reitera la respuesta diferencial. La concentración de AS que induce tal respuesta puede ser muy variable tal y como se demostró en el desarrollo de raíces de *Catharanthus roseus* utilizando concentraciones femtomolares de AS (Echevarría-Machado *et al.*, 2007), lo que indica la importancia de esta molécula en el crecimiento y desarrollo en las raíces así como en la morfología de las raíces (Bagautdinova *et al.*, 2022) especialmente si se requiere de su aclimatación y establecimiento en condiciones naturales, aunque cada especie responderá a diferentes concentraciones y condiciones de tratamiento. Cabe mencionar que el sistema de raíces de las tres especies aquí investigadas presenta diferencias sustanciales, por ejemplo, *Epidendrum* sp. presenta raíces aéreas, y no presenta bulbos como en el caso de *Encyclia* sp. y *Laelia autumnalis*, lo que puede estar asociado fuertemente a sus respuestas diferenciales a el tratamiento de AS.

De acuerdo con Vasco-Ávila (2020), la supervivencia de las plántulas de orquídeas se puede asegurar si durante su crecimiento se alcanza un número apropiado de follaje y sistema radicular (número de raíces y longitud); además, el éxito de los brotes, y el número de raíces por brote, son los factores clave para la aclimatación de las plántulas.

En este estudio se encontró que las microplantas de orquídeas precultivadas en 10 μM de AS incrementaron significativamente la supervivencia en las tres especies; y los tratamientos en la concentración 1 μM de AS en *L. autumnalis* y *Epidendrum* sp. y la concentración 100 μM de AS solo en *Encyclia* sp. Lo que reitera que cada especie va a responder diferencialmente a la concentración de AS. Khan *et al.* (2014), hacen énfasis en que el uso de AS influye en las funciones de la planta de una manera dependiente de la dosis; y a una alta concentración beneficia la tolerancia y por lo tanto la supervivencia al estrés abiótico como lo demostrado en *Vigna radiata* L.

Contrariamente Gómez-Llaca (2015), encontró que en clones de yuca tratados en concentraciones bajas de AS (10, 1 y 0.1 μM) hubo un notable incremento en la supervivencia mientras que en concentraciones altas (100 y 1000 μM) se vio afectada durante la aclimatación en condiciones de laboratorio y durante el trasplante a condiciones de vivero y producción. En el mismo estudio se señala que las bajas concentraciones de AS favorecen el vigor y desarrollo de las plantas en condiciones de cultivo *in vitro* y aclimatación, como lo ocurrido en *Epidendrum* sp., y *Encyclia* sp. de este estudio. Se ha demostrado además que la inhibición del crecimiento por fitohormonas puede ser una ventaja al trasplante a condiciones *ex vitro*, ya que dicha inhibición promueve mayor vigor en las plantas (Mora-Herrera *et al.*, 2005). Para el caso de *L. autumnalis*, se observa que el uso de altas concentraciones de AS, aunque disminuyen la supervivencia y el crecimiento de las microplantas, estas respuestas pueden considerarse para conservación *in vitro* bajo crecimiento mínimo, donde lo ideal es inhibir el crecimiento. Este comportamiento lo describen López-Delgado y Scott (1997), para el cultivo de *Solanum tuberosum* L.; y Alvarenga-Venutolo *et al.*, (2007) lo demuestran en cultivo *in vitro* de *Sechium edule* (Jacq.) (chayote).

Es importante considerar que la concentración adecuada de AS para las respuestas de supervivencia, aclimatación, o conservación en mínimo crecimiento, es dependiente de la especie con la que se trabaja. Por lo que, Gómez-Llaca (2015), hace hincapié que para cada planta deben realizarse ensayos preliminares para determinar cuál o cuáles son las concentraciones idóneas de AS.

CONCLUSIONES

El precultivo con ácido salicílico 10 μM de microplantas de orquídeas de *Epidendrum* sp., *Encyclia* sp., y *L. autumnalis* incremento el peso fresco y la supervivencia a condiciones *ex vitro*. Los resultados muestran que existe una respuesta diferencial en los parámetros de crecimiento al precultivo con ácido salicílico de microplantas de orquídeas de *Epidendrum* sp., *Encyclia* sp., y *L. autumnalis*.

Funding. This research was funded by the Centro Universitario UAEM Tenancingo and authors.

Conflict of interest. The authors declare they have no conflict of interest.

Compliance with ethical standards. This work used biological material donated from a backyard collection of one of the authors, and was multiplied under *in vitro* conditions. Therefore, permission from SEMARNAT or CONABIO was not necessary.

Data availability. The authors we agree that the data obtained in this study will be broadcasted.

Author contribution statement (CRediT). **M.E. Mora-Herrera** – Head of research line, problem statement, monitoring and methodological analysis, original draft, writing - review and final editing. **J.M. Olivares-Aguilar** – execution of experiments, original draft and analysis of results. **D.Y. Reyes-Araujo** – bibliography update, analysis of results, editing., **S.E. Ceballos-Vásquez** – Bibliography update, editing. **R. García-Velasco** – statistical analysis, results.

REFERENCES

- Alvarenga-Venutolo, S., Abdelnour-Esquivel, A. and Villalobos Aránbula, V., 2007. Conservación *in vitro* de chayote (*Sechium Edule*). *Agronomía Mesoamericana*, 18(1), pp. 65-73. <https://doi.org/10.15517/am.v18i1.5037>
- Bagautdinova, Z.Z., Omelyanchuk, N., Tyapkin, A.V., Kovrizhnykh, V.V., Lavrekha, V.V. and Zemlyanskaya, E.V., 2022. Salicylic acid in root growth and development. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, p.2228. <https://doi.org/10.3390/ijms23042228>
- Brush, S. and Stephen, B., 1995. *In situ* conservation of landraces in centers of crop diversity. *Crop Science*, 35(2), pp. 346-354. <https://doi.org/10.2135/cropsci1995.0011183X003500020009x>
- Camacho-Villa, T. C., Aparicio-Sánchez, S., Costich, D.E. and Vidal-Martínez V.A., 2024. Dinámicas de mantenimiento y de pérdida in situ del maíz raza Jala. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 15(1), p.e3247. <https://doi.org/10.29312/remexca.v15i1.3247>
- Campos, R., Joseph, A.C.M., Campos, R.S., Chico, R.J and Cerna, R.L., 2020. Establecimiento de un protocolo de desinfección y micropropagación *in vitro* de "caoba" *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae). *Arnaldoa*, 27(1), pp. 141-156. <https://dx.doi.org/10.22497/arnaldoa.271.27107>
- CONABIO, 2022. ¿Qué es la biodiversidad?, Biodiversidad mexicana, Biodiversidad: nuestra defensa natural más fuerte contra el cambio climático (Consultado 29 de agosto de 2024). https://www.biodiversidad.gob.mx/biodiversidad/que_es.html
- Cruz, E.G. and Mora-Herrera, M.E., 2018. Efecto del ácido salicílico (AS) en la supervivencia y la adaptación de *Encyclia* sp. en condiciones *ex vitro*. Primer Congreso Mexicano de Fisiología Vegetal. Colegio de Postgraduados, Texcoco Estado de México de 24 al 26 de octubre de 2018. p 111.
- Echevarría-Machado, I., Escobedo-GM, R.M. and Larqué-Saavedra, A., 2007. Responses of transformed *Catharanthus roseus* roots to femtomolar concentrations of salicylic acid. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(6-7), pp.501-507. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.04.003>
- Espinosa-Reyes, Á., Silva-Pupo, J.J., Bahi-Arevich, M. and Romero-Cabrera, D., 2019. Influencia del tamaño de las plantas *in vitro* y tipo de sustrato en la aclimatación de *Morus alba* L. *Pastos y Forrajes*, 42(1), pp. 23-29.
- Espinoza, N.O., Estrada, R., Silva-Rodríguez, D., Tovar, P., Lizarraga, R. and Dodds, J.H., 1986. The potato: a model. *Crop Plant for Tissue Culture. Outlook on Agricultura*, 15, pp. 21-26. <https://doi.org/10.1177/0030727086015001>
- Gómez-Llaca, J.A., 2015. Uso del ácido acetilsalicílico en la conservación *in vitro* bajo mínimo crecimiento de dos clones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) y determinación de su viabilidad. Tesis de maestría en Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. <http://hdl.handle.net/10872/11837>
- Harris, V.C., Landero, B.I., Alvarado, V.J.F. and Hernández, G.R., 2021. Germinación de orquídeas utilizando un método sencillo y económico, reproducible en ambientes no óptimos. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 12(5), pp. 915-919. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i5.2555>
- Hernández-Bello, M. and Mora-Herrera, M.E., 2021. Evaluación de raíz de microplantas de *Laelia autumnalis* precultivadas en ácido salicílico en la organogénesis. 3º congreso Mexicano de Fisiología Vegetal, 1º congreso internacional, Tepatitlán de Morelos, Jalisco. <https://www.congreso.redfisiologosvegetales.com.mx/memoriastercercongreso/>
- Khan, M.I.R., Asgher, M and Khan, N.A., 2014. Alleviation of salt-induced photosynthesis and growth inhibition by salicylic acid involves glycinebetaine and ethylene in

- mungbean (*Vigna radiata* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, pp. 67-74. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.03.026>
- Khodary, S.E.A., 2004. Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt stressed maize plants. *International Journal of Agriculture and Biology*, 6, pp. 5-8.
- Larqué-Saavedra, A. and Martín-Mex, R., 2007. Effects of salicylic acid on the bioproductivity of plants. En Hayat, S; Ahmad, A. eds. *Salicylic acid a plant hormone*. Springer. pp. 15-23. https://doi.org/10.1007/1-4020-5184-0_2.
- Larqué-Saavedra, A., Martín-Mex, R., Nexticapán-Garcéz, Á., Vergara-Yoisura, S. and Gutiérrez-Rendón, M., 2010. Efecto del ácido salicílico en el crecimiento de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 16(3), pp. 183-187. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S152X2010000300006&script=sci_arttext
- Lee, Y.I. and Lee, N., 2003. Plant regeneration from protocorm-derived callus of *Cypripedium formosanum*. In *in vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39, pp. 475-479. <https://doi.org/10.1079/IVP2003450>
- Lopez-Delgado, H. and Scott, I.M., 1997. Induction of *in vitro* tuberization of potato microplants by acetylsalicylic acid. *Journal of Plant Physiology*, 151(1), pp. 74-78. [https://doi.org/10.1016/s076-1617\(97\)80039-9](https://doi.org/10.1016/s076-1617(97)80039-9)
- Mady, M., 2009. Effect of foliar application with salicylic acid and vitamin e on growth and productivity of tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.). *Plant Journal of Plant Production*, 34(6), pp. 6715-6726. <https://doi.org/10.21608/jpp.2009.118654>
- Menchaca-García, R.A. and Moreno-Martínez D., 2011. Conservación de orquídeas, una tarea de todos. Primera edición, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México. p 45 https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/244895/Conservacion_de_orquideas_una_tarea_de_todos.pdf
- Mora-Herrera, M.E., López-Delgado, H., Castillo-Morales, A. and Foyer, C.H., 2005. Salicylic acid and H₂O₂ function by independent pathways in the induction of freezing tolerance in potato. *Physiologia Plantarum*, 125(4), pp. 430-440. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00572.x>
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15, pp. 473-497.
- Novak, S.D., Luna, L.J. and Gamage, R.N., 2014. Función de la auxina en el desarrollo de las orquídeas. *Plant Signaling & Behavior*, 9(10), pp. e972277-8. <https://doi.org/10.4161/psb.32169>
- Peng, Y., Yang, J., Li, X. and Zhang, Y., 2021. Salicylic acid: biosynthesis and signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 72, pp. 761-791. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-081320-092855>
- Podwyszynska, M., Orlikoska, T., Trojaj, A. and Wojtania, A., 2022. Application and improvement of *in vitro* culture systems for commercial production of ornamental, fruit, and industrial plants in poland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 91, pp. 1-29. <https://doi.org/10.5586/asbp.914>
- Poot-Poot, W.A; Delgado-Martínez, R., Castro-Nava, S., Segura-Martínez, M.T., Carreón-Pérez, A. and Hernández-Martínez, J.G., 2018. Efecto del ácido salicílico en la aclimatación pre-trasplante de poblaciones nativas de tomate. *Horticultura brasileña*, 36, pp. 480-485. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-053620180409>
- Rivas-San Vicente, M. and Plasencia, J., 2011. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 62(10), pp. 3321-3338. <https://doi.org/10.1093/jxb/err031>
- Salazar-Mercado, S.A., 2012. Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombrain (Orchidaceae). *Acta Agronómica*, 61(1), pp. 69-79. <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v61n1/v61n1a09.pdf>
- Sánchez-Sotomayor, H.J., Orellana-García, A., Roel, B.I.A., Marín, B.M., Peña, R.G., Andía, A.V. and Estrada, J.R.V., 2021. Conservación *ex situ* mediante el establecimiento de cultivo *in*

- in vitro* de semillas de *Prosopis limensis* “Huarango” de Ica, Perú. *Manglar*, 18(4), pp. 427-433.
<http://dx.doi.org/10.17268/manglar.2021.055>
- SEMARNAT, 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario oficial.
https://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM_059_SEMARNAT_2010.pdf
- Shimura, H. and Koda, Y., 2004. Micropropagation of *Cyrtopodium macranthos* var. *rebutense* through protocorms-like bodies derived from mature seeds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78, pp. 273-276.
<https://doi.org/10.1.3/B:TICU.0000025641.49000.b5>
- Silva, J.T., Hossain, M.M., Sharma, M., Dobránszki, J., Cardoso, J.C. and Zeng, S., 2017. Acclimatization of *in vitro* derived *Dendrobium*. *Horticultural Plant Journal*, 3(3), pp. 110-124.
<https://doi.org/10.1016/j.hpj.2017.07.009>
- Sommer, R.J., 2020. Phenotypic plasticity: from theory and genetics to current and future challenges. *Genetics*, 215(1), pp. 1-13.
<https://doi.org/10.1534/genetics.120.303163>
- Soto, V.M.A., Morales, S.F.J. and Rodríguez, A.P.J., 2021. Germinación y crecimiento *in vitro* de especies de orquídeas amenazadas en comunidades aledañas al Biotopo del Quetzal. Informe. Consultado 30 de agosto de 2024.
<https://digi.usac.edu.gt/bvirtual/informes/puina/INF-2020-76.pdf>
- Soto-Arenas, M, Solano G.R. and Hagsater, E., 2007. Risk of extinction and patterns of diversity loss in Mexican orchids. *Lankesteriana: International Journal on Orchidology*, 7(1-2), pp. 114-121.
<https://doi.org/10.15517/lank.v7i1-2.18449>
- Swarts, N.D. and Dixon, K.W., 2009. Perspectives on orchid conservation in botanic gardens. *Trends in Plant Science* 14(11), pp. 590-598.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.07.008>
- Tejeda-Sartorius, O., Téllez-Velasco, M.A.A. and Escobar-Aguayo, J.J., 2018. Estado de conservación de orquídeas silvestres (Orchidaceae). *Agro Productividad*, 10(6), pp. 3-12.
<https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/1031>
- Tucuch-Haas, C., Alcántar-González, G., Salinas-Moreno, Y., Trejo-Téllez, L.I., Volke-Haller, V.H. and Larqué-Saavedra, A., 2017. Aspersión foliar de ácido salicílico incrementa la concentración de fenoles en el grano de maíz. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(2), pp. 235-238.
<https://doi.org/10.35196/rfm.2017.2.235-238>
- Vasco-Ávila, C.A., 2020. Evaluación del enraizamiento *in vitro* y aclimatación de plántulas de la orquídea *Epidendrum ibaguense*. Proyecto de Experimentación de Tecnólogo en Gestión y Producción Hortícola: Universidad Militar Nueva Granada Cajicá Cundinamarca, Colombia.
<http://hdl.handle.net/10654/35961>
- Zeng, S., Huang, W., Wu, K., Zhang, J., Da Silva-Teixeira, J.A. and Duan, J., 2016. Propagación *in vitro* de orquídeas *Paphiopedilum*. *Reseñas Críticas en Biotecnología*, 36(3): pp. 521-534.
<http://doi.org/10.3109/07388551.2014.993585>