

Accepted Manuscript / Manuscrito Aceptado

Title Paper/Título del artículo:

***Laelia speciosa* (Kunth) Schltr., un recurso genético en riesgo de extinción:
alternativas de propagación y caracterización molecular**

***Laelia speciosa* (Kunth) Schltr., a genetic resource at risk of extinction:
propagation alternatives and molecular characterization**

Authors/Autores: Medina-Mendoza, C., Rodríguez de la O. J. L., Legaria-Solano J. P.

ID: e2030

DOI: <https://doi.org/10.15741/revbio.13.e2030>

Received/Fecha de recepción: July 16th 2025

Accepted /Fecha de aceptación: June 25th 2026

Available online/Fecha de publicación: August 13, 2026

Please cite this article as/Como citar este artículo: Medina-Mendoza, C., Rodríguez de la O. J. L., Legaria-Solano J. P. (2026). *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr., a genetic resource at risk of extinction: propagation alternatives and molecular characterization. *Revista Bio Ciencias*, 13, e2030. <https://doi.org/10.15741/revbio.13.e2030>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Este archivo PDF es un manuscrito no editado que ha sido aceptado para publicación. Esto es parte de un servicio de Revista Bio Ciencias para proveer a los autores de una versión rápida del manuscrito. Sin embargo, el manuscrito ingresará a proceso de edición y corrección de estilo antes de publicar la versión final. Por favor note que la versión actual puede contener errores de forma.

Artículo original

***Laelia speciosa* (Kunth) Schltr., un recurso genético en riesgo de extinción: alternativas de propagación y caracterización molecular**

***Laelia speciosa* (Kunth) Schltr., a genetic resource at risk of extinction: propagation alternatives and molecular characterization**

***Laelia speciosa*, un recurso genético en riesgo de extinción /**

***Laelia speciosa*, a genetic resource at risk of extinction**

Medina Mendoza, C.¹ * () , Rodríguez de la O. J. L.² () , Legaría Solano J. P.² () .

^{*1}Ingeniería en Alimentos. Universidad Tecnológica del Valle del Mezquital. Carretera Ixmiquilpan-Capula, Km 4, Nith, 42300, Ixmiquilpan, Hgo.

²Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco, Chapingo, Km. 38.5, 56230, Texcoco, Estado de México.

***Corresponding Author:**

Carmen Medina-Mendoza. Ingeniería en Alimentos. Universidad Tecnológica del Valle del Mezquital. Ixmiquilpan-Capula, Carretera Km 4, Nith, Ixmiquilpan, 42300, Hidalgo. Teléfono: (759) 723 2789. E-mail: cmedina@utvm.edu.mx

RESUMEN

Laelia speciosa (Kunth) Schltr., es una orquídea epífita endémica de México, que se encuentra de forma natural en regiones montañosas frías y secas, a altitudes entre 1400 y 2400 metros sobre el nivel del mar. Está protegida por la NOM-059-SEMARNAT-2010 y está sujeta a restricciones comerciales internacionales debido a la recolección ilegal y la destrucción de su hábitat. El objetivo de este estudio fue desarrollar métodos alternativos de propagación y caracterizar molecularmente a *L. speciosa* mediante técnicas *in vitro* y marcadores moleculares. Se probaron diferentes condiciones para la germinación de semillas, la multiplicación de brotes y la aclimatación. El análisis molecular se realizó mediante marcadores RAPD con 16 cebadores de la serie A. La tasa de germinación más alta se logró con la adición de benciladenina, vitaminas WS y extracto de malta. Una combinación de 2,4-D y kinetina promovió el desarrollo óptimo del explante, mientras que un sustrato compuesto por tezontle rojo y peat most favoreció una aclimatación exitosa. La caracterización molecular mediante marcadores RAPD reveló variación genética tanto dentro como entre especies. Estos hallazgos enfatizan la importancia de los protocolos *in vitro* específicos para cada especie, combinados con herramientas moleculares, para la conservación y propagación de esta orquídea endémica.

PALABRAS CLAVE:

Orquídea, protección especial, cultivo *in vitro* y marcadores moleculares.

ABSTRACT

Laelia speciosa (Kunth) Schltr., is an epiphytic orchid endemic to Mexico, naturally found in cold, dry mountainous regions at elevations between 1,400 and 2,400 meters above sea level. It is protected under NOM-059-SEMARNAT-2010 and is subject to international trade restrictions due to illegal harvesting and habitat destruction. This study aimed to develop alternative propagation methods and perform molecular characterization of *L. speciosa* using *in vitro* techniques and molecular markers. Different conditions for seed germination, shoot multiplication, and acclimatization were tested. Molecular analysis was conducted using RAPD markers with 16 a-series primers. The highest germination rates were achieved with the addition of benzyladenine, WS vitamins, and malt extract. A combination of 2,4-D and kinetin promoted optimal explant development, while a substrate composed of red tezontle and peat supported successful acclimatization. Molecular characterization with RAPD markers revealed genetic variation both within and between species. These findings emphasize the importance of species-specific *in vitro* protocols, combined with molecular tools, for conserving and propagating this endemic orchid.

KEYWORDS:

Orchid, special protection, *in vitro* culture, molecular markers.

Introducción

La familia Orchidaceae es uno de los grupos de plantas más diversos del mundo, con aproximadamente 30 000 especies conocidas en los ecosistemas mexicanos (Flores *et al.*, 2020). Se estima que el 40 % de las orquídeas mexicanas son endémicas (Castellanos *et al.*, 2023). *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr., es una epífita de gran importancia ornamental y cultural en México. Sin embargo, la NOM-059-SEMARNAT-2010 clasifica esta especie como de protección especial, debido a que es frecuentemente recolectada en el medio silvestre y vendida ilegalmente. Esta presión, junto con la destrucción de su hábitat y la deforestación, ha provocado la disminución de sus poblaciones silvestres (Flores *et al.*, 2020).

Por lo tanto, es esencial desarrollar métodos sostenibles para la propagación y caracterización de las orquídeas. Sin embargo, la propagación clonal *in vitro* de *L. speciosa* sigue siendo un reto debido a las dificultades de germinación de las semillas (Mayo *et al.*, 2022). El cultivo a partir de semillas es importante porque favorece la diversidad genética. Por lo tanto, los protocolos *in vitro* deben ser específicos para cada especie y considerar factores como la madurez de la cápsula, la composición del medio de cultivo, la luz y la temperatura (Ávila *et al.*, 2009).

El medio Murashige y Skoog (MS), (1962), suplementado con vitaminas Wetmore y Sorokin (WS), (1955), 2.5 mg/L de ácido naftalenacético (NAA), 2.5-3.0 mg/L de benciladenina (BA) y 2 mg/L de ácido indolacético (IAA), logró de forma constante una germinación del 100 % en diversas especies de *Laelia* (Lee *et al.*, 2007; Mayo *et al.*, 2020). Además, la formación de estructuras similares a protocormos en el género *Laelia* se optimizó con 2.5 mg/L de NAA, 1-3 mg/L de BA y 2 mg/L de IAA (Lee *et al.*, 2007; Sarabia *et al.*, 2010). En *L. speciosa*, se logró el desarrollo de segmentos foliares y raíces de color verde claro con 2.5 mg/L de bencilaminopurina (BAP), lo que favoreció la propagación masiva mediante cuerpos similares a protocormos (Lee *et al.*, 2007; Sarabia *et al.*, 2010).

Cada etapa del cultivo *in vitro* requiere una gestión cuidadosa. La aclimatación es especialmente importante debido a las altas tasas de mortalidad y al estrés fisiológico que se produce durante la transición a condiciones *ex vitro*. Por lo tanto, el uso de mezclas de sustratos específicos y pretratamientos es esencial para optimizar el crecimiento y mejorar las tasas de supervivencia (Ávila

et al., 2009; Ortega *et al.*, 2011). Por ejemplo, se ha logrado una tasa de supervivencia del 70 % con una proporción de 1:1 de tezontle y corteza de roble (Ortega *et al.*, 2011).

Más allá de los protocolos de micropropagación, la caracterización genética es esencial para establecer huellas genéticas específicas de cada especie mediante PCR (Erzurumlu *et al.*, 2018). El análisis genético ofrece información muy precisa sobre la diversidad genética. Uno de los métodos más comunes es el análisis de DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD), que utiliza cebadores aleatorios para amplificar secuencias de DNA y generar marcadores moleculares. Estos marcadores complementan las técnicas de caracterización tradicionales y ayudan a aclarar las relaciones genéticas entre especies (Hartati *et al.*, 2023).

Los marcadores RAPD dependen de la amplificación de fragmentos de DNA mediante cebadores aleatorios y son una herramienta fiable para estudiar la diversidad genética en las plantas (Kumar *et al.*, 2018). Este método es muy apreciado por su simplicidad y eficacia al generar perfiles genéticos, que luego se utilizan para crear dendrogramas filogenéticos. Además, el análisis RAPD respalda los datos morfológicos y ayuda a caracterizar la diversidad genética y bioquímica dentro y entre poblaciones (Erzurumlu *et al.*, 2018), lo que lo hace accesible para la mayoría de los laboratorios (Hartati *et al.*, 2023). Esta técnica se ha utilizado ampliamente para evaluar la diversidad genética entre parientes e híbridos en géneros de orquídeas como **Paphiopedilum**, **Dendrobium**, **Coelogyne** y **Phalaenopsis** (Choopeng *et al.*, 2019; Balilashaki *et al.*, 2022; Hartati *et al.*, 2023).

Numerosas investigaciones han demostrado que los marcadores tipo RAPD son muy eficaces para analizar las relaciones genéticas en las orquídeas debido a sus altos niveles de polimorfismo (Hon *et al.*, 2020; Mursyidin *et al.*, 2022; Hartati *et al.*, 2023). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue desarrollar métodos alternativos de propagación y caracterización de *L. speciosa* mediante técnicas de cultivo *in vitro* y marcadores moleculares RAPD.

Material y Métodos

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Cultivo de Tejidos y Biología Molecular del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

Cultivo *in vitro*

El proceso de cultivo *in vitro* se dividió en tres etapas y se llevó a cabo bajo condiciones y tratamientos específicos, tal como se resume en la Tabla 1.

Para la germinación, se obtuvieron cápsulas cerradas de *L. speciosa* del Orquidario (Dr. y Gral. Alberto Oviedo Mota) en Morelia, Michoacán de Ocampo. Siguiendo la metodología de Sheena (2000), las semillas se sembraron en medio basal de MS (1962) suplementado con 100 mg/L de mio-inositol a, 0.5 mg/L de piridoxina, 20 mg/L de sacarosa y 8 mg/L de agar, con pH ajustado a 5.7. Se evaluaron los efectos de diversos aditivos, entre ellos extracto de malta, sulfato de adenina, benciladenina (BA), kinetina, ácido indolacético (IAA) y vitaminas WS (Wetmore & Sorokin, 1955).

Las condiciones de incubación se mantuvieron a 25 ± 1 °C con un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad). Las lámparas fluorescentes blancas proporcionaron una intensidad lumínica de $68 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Se evaluaron las siguientes variables entre 30 y 50 días después de la siembra (DAS): hinchamiento del embrión (ES), apertura de la testa (TO), formación de cuerpos similares a

protocormos (PBL) con una hoja (1L) y con dos hojas (2L), germinación total (TG) y ausencia de germinación (NG).

Para la fase de multiplicación, se utilizó medio basal MS para evaluar los efectos del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), de la kinetina, del extracto de malta y de la caseína hidrolizada. Se emplearon PBL con 50 días y dos hojas como explantes. Durante 60 días se registraron las siguientes variables: número de brotes (SN), longitud de los brotes (SL), número de raíces (RN), longitud de las raíces (RL) y número de hojas (LN).

Durante la fase de aclimatación, se utilizaron plántulas de 5 cm de altura con al menos tres raíces y se trasplantaron a bandejas con mezclas de sustrato de tezontle rojo, turba, corteza de pino y vermiculita, tal y como se especifica en la tabla 1. Para mantener una alta humedad, las bandejas permanecieron cubiertas durante las dos primeras semanas. Posteriormente, se llevó a cabo un proceso de endurecimiento gradual: se descubrieron las bandejas por la mañana y se cubrieron por la tarde durante 60 días. Se midieron las siguientes variables: altura de la planta (PH), número de hojas (NL), número de raíces (NR), longitud de las raíces (RL, en centímetros) y color de la planta (PC).

Tabla 1. Tratamientos evaluados para el cultivo *in vitro* de *L. speciosa*.

Etapa	Tratamientos
Germinación	T1. BA 0.2 mg/L + Kinetina 2 mg/L
	T2. BA 0.2 mg/L + IAA 2 mg/L
	T3. BA 0.2 mg/L + Vitaminas WS 10 %
	T4. Kinetina 2 mg/L + IAA 2 mg/L
	T5. IAA 2 mg/L + Vitaminas WS 10 %
	T6. Extracto de malta 500 mg/L
	T7. Sulfato de adenina 100 mg/L
Multiplicación	T1. 2,4-D 0.5 mg/L + kinetina 2 mg/L
	T2. Extracto de malta 500 mg/L + kinetina 500 mg/L
	T3. Caseína hidrolizada 500 mg/L + kinetina 0.3 mg/L
Aclimatación	T1. Tezontle rojo (100 %)
	T2. Tezontle rojo + peat most (1:1)
	T3. Corteza de pino + peat moss (1:1)
	T4. Peat moss + vermiculita (2:1)

T= tratamiento

Extracción y purificación de DNA

Para establecer un parámetro comparativo entre las especies, se realizó un análisis molecular de *L. speciosa* y *Cattleya aurantiaca*. Se extrajo DNA genómico a partir de 0.3 g de tejido fresco de hojas y tallos de plántulas *in vitro*. La purificación se realizó según el método descrito por Dellaporta *et al.* (1983), con algunas modificaciones. El RNA contaminado se eliminó añadiendo 2 µL de solución de ARNasa (10 mg/MI) por muestra. El DNA resultante se disolvió en amortiguador TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA). La concentración de DNA se midió por absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro UV/Vis Jenway 6305. Al mismo tiempo, se comprobó la integridad y la calidad del DNA mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 % (p/v), teñido con bromuro de

etidio (0.5 mg/mL). Por último, las muestras de DNA se diluyeron hasta una concentración de trabajo de 10 ng/μL.

Marcadores RAPD

Se seleccionaron dieciséis cebadores de la serie A (Operon Technologies, Alameda, California, EE. UU.) por su alto grado de polimorfismo. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 25 μL, compuesto por 4.0 μL de agua bidestilada estéril, 10 μL de dNTP (500 μM), 2.5 μL de tampón PCR 10X, 1.0 μL de MgCl₂ (50 mM), 2.0 μL de cada cebador (10 pmol), 0.5 μL de Taq DNA polimerasa (5 U/μL) y 5.0 μL de DNA genómico (10 ng/μL). La amplificación se realizó utilizando un termociclador Techne TC-412 con el siguiente programa: una desnaturalización inicial a 94 °C durante 9 minutos; 35 ciclos de 94 °C durante 60 segundos, 37 °C durante 60 segundos y 72 °C durante 60 segundos; seguidos de una extensión final a 72 °C durante 7 minutos.

Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2 % (p/v) utilizando tampón TAE (40 mM de tris-acetato, pH 7.6; 1 mM de Na₂EDTA) a 85 V durante 3 horas. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 μg/mL) y se visualizaron bajo luz UV mediante un sistema de imagen Kodak EDAS 290. Todas las reacciones se realizaron al menos en duplicado para garantizar la reproducibilidad de los patrones RAPD.

Análisis de datos

La etapa de germinación se examinó mediante un modelo de probabilidad binomial con siete tratamientos y cinco réplicas. Las proporciones se compararon mediante la prueba Z, con un nivel de significación $\alpha = 0.05$. Para las etapas de multiplicación y aclimatación, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Dado que los datos no cumplían los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se aplicó una transformación de rangos, seguida de comparaciones múltiples con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

Las relaciones genéticas entre genotipos se determinaron a partir de las similitudes y diferencias en los patrones de bandas. Se creó una matriz binaria que registró la presencia (1) o ausencia (0) de bandas para cada cebador, identificando cada producto por su distancia de migración relativa. Estos datos conformaron la Matriz de Datos Básicos (BDM). A partir de la BDM, se calculó una matriz de similitud utilizando el coeficiente de Jaccard (1908). Posteriormente, se construyó un dendrograma mediante el método de grupos de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA). Para mejorar la fiabilidad estadística, se realizó un análisis bootstrap con 1000 remuestreos utilizando NTSYS-pc versión 2.2.

Resultados y Discusión

Micropropagación

Durante la fase de germinación, los tratamientos tres (BA combinado con vitaminas WS) y seis (extracto de malta) produjeron los niveles más altos de hinchamiento del embrión, principalmente al estimular la imbibición. Esta respuesta fisiológica mejoró posteriormente otros parámetros, como la apertura de la testa y el desarrollo de cuerpos similares a protocormos (PLB) con una o dos hojas (Tabla 2). Sin embargo, deben considerarse factores como la madurez de la cápsula y la composición del medio de cultivo, ya que influyen de manera considerable en el momento de germinación de esta especie (Mayo *et al.*, 2022).

Las tasas de germinación oscilaron entre el 42 % y el 63 %, y el tratamiento con hidrolizado de caseína alcanzó el valor más alto, significativamente superior al de los demás ($\alpha = 0.05$). Estos

resultados concuerdan con los publicados por Aguilar *et al.* (2013), quienes observaron tasas de germinación del 60 % al 100 % en medio MS con sulfato de adenina. Estos hallazgos sugieren que los aditivos orgánicos influyen significativamente en el éxito general de la germinación de las semillas.

Tabla 2. Efecto de los tratamientos en la etapa de germinación de *L.speciosa*.

Tratamientos	ES	TO	PLB-1L	PLB-2L	TG	NG
1. BA + Kinetina	0.52 ^d	0.42 ^c	0.26 ^c	0.14 ^d	0.48 ^d	0.52 ^a
2. BA + IAA	0.50 ^d	0.36 ^c	0.24 ^c	0.14 ^d	0.42 ^d	0.58^a
3. BA + Vitaminas WS	1.00^a	0.94^a	0.92^a	0.84^b	0.56 ^b	0.43 ^c
4. Kinetina + IAA	0.62 ^d	0.50 ^c	0.30 ^c	0.14 ^d	0.52 ^c	0.47 ^b
5. IAA + Vitaminas WS	0.96 ^b	0.94 ^a	0.84 ^a	0.74 ^b	0.52 ^c	0.48 ^b
6. Extracto de malta	1.00^a	0.96^a	0.96^a	0.96^a	0.53 ^c	0.47 ^b
7. Caseína hidrolizada	0.76 ^c	0.64 ^b	0.58 ^b	0.50 ^c	0.63^a	0.36 ^d

Los promedios representan el porcentaje de ocurrencia del evento para cada tratamiento, con cuatro réplicas, y el valor final registrado en cinco fechas. Los valores con la misma letra son estadísticamente iguales a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. ES: hinchazón del embrión, TO: apertura de la testa, PLB-1L: estructura similar al protocormo con una hoja, PLB-2L: estructura similar al protocormo con dos hojas, TG: germinación total, NG: sin germinación.

Durante la fase de multiplicación, el medio basal MS suplementado con 2,4-D y kinetina (tratamiento 1) promovió el desarrollo de cuerpos similares a protocormos (PBLs). Por el contrario, la combinación de caseína y kinetina (tratamiento 3) produjo el mayor número de raíces, con una diferencia estadísticamente significativa ($\alpha=0.05$; Tabla 3). Estos resultados respaldan hallazgos previos que indican que aditivos como NAA, BA e IAA facilitan la formación de PBL en *L. speciosa* (Sarabia *et al.*, 2010; Mayo *et al.*, 2022). Mientras que Mayo *et al.* (2022) identificaron un desarrollo óptimo de las plántulas en medio MS suplementado con 0.5 mg/L de NAA y 0.1 mg/L de ácido giberélico. Sabira *et al.* (2010) y Cardoso *et al.* (2020) informan sobre la inducción de callos con 2.5 mg/L de NAA y 1 mg/L de BAP; los protocormos específicos para el desarrollo mediante PLB en esta especie siguen siendo limitados.



Figura 1. Estructuras tipo protocormos y formación de hojas y raíces en medio de cultivo.

Tabla 3. Efecto de los tratamientos en la etapa de multiplicación de *L. speciosa*.

Tratamientos	SN	SL	RN	RL	LN
1. 2,4-D + kinetina	38.5^a	19.0 ^a	2.1 ^a	16.0 ^a	2.1 ^a
2. Extracto de malta + kinetina	29.5 ^a	32.0^a	1.9 ^a	29.0 ^a	3.6^a
3. Caseína hidrolizada + kinetina	10.0 ^b	27.0 ^a	3.8^b	33.0^a	2.1 ^a

Los datos se expresan como porcentajes de la media; las letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas con $p = 0.05$. NS: número de brotes, SL: longitud de los brotes, NR: número de raíces, RL: longitud de las raíces, y NL: número de hojas.

Durante la etapa de aclimatación, la altura de las plantas, el número y la longitud de las raíces variaron significativamente ($\alpha = 0.05$), y el tratamiento 2 (tezontle rojo y turba) produjo los mejores resultados (Tabla 4). Este rendimiento se debe a la porosidad de la mezcla de sustrato, lo que aumentó la disponibilidad de humedad durante las etapas clave del crecimiento (Ávila *et al.*, 2009). Dado que las orquídeas del género *Laelia* son especialmente sensibles al encharcamiento y al exceso de humedad (Li *et al.*, 2021), los sustratos que equilibran el drenaje y la retención de humedad resultan esenciales para el establecimiento exitoso de las plántulas.

La tasa de supervivencia durante la etapa de aclimatación alcanzó el 80 % en el tratamiento dos (tezontle rojo y peat moss). Esto confirma que esta combinación de sustratos retiene eficazmente la humedad, satisfaciendo así las necesidades fisiológicas específicas de la especie y favoreciendo el crecimiento saludable de las plántulas. Estos resultados coinciden con los reportados por Ávila (2007) respecto de las plántulas de *L. speciosa*.

Tabla 4. Efecto de los tratamientos en la etapa de aclimatación de *L. speciosa*.

Tratamientos	PH (cm)	NL	NR	RL (cm)	PC
1. Tezontle rojo	5.4 ^a	7.0^a	5.5 ^b	4.0 ^c	2.9^a
2. Tezontle rojo + peat moss	6.4^a	4.9 ^b	8.0^a	8.2^a	2.9^a
3. Corteza de pino + peat moss	5.4 ^a	3.3 ^b	2.8 ^c	5.3 ^b	2.1 ^a
4. Peat moss + vermiculita	3.7 ^b	5.8 ^{ab}	4.5 ^b	3.4 ^c	2.9 ^a

Los resultados se expresan como porcentajes de la media; las letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas con un valor de $p = 0.05$. PH: altura de la planta, NL: número de hojas, NR: número de raíces, RL: longitud de la raíz, PC: color de la plántula. Fuente propia.



Figura 2. Aclimatación de *L. speciosa* en sustrato.

Según Mayo *et al.* (2022), las respuestas morfológicas en cultivos *in vitro* dependen en gran medida de la especie; por lo tanto, los protocolos deben optimizarse específicamente para el género *Laelia*, en particular para *L. speciosa*. Nuestros hallazgos enfatizan la importancia de la evaluación continua de los suplementos de los medios de cultivo para mantener un equilibrio fisiológico preciso en cada etapa de la micropropagación. Dicha optimización es esencial para desarrollar protocolos eficaces y reproducibles que respalden la conservación y el cultivo exitosos de esta especie de orquídea.

Caracterización molecular

Se aisló con éxito DNA genómico de alta calidad, en concentraciones que oscilaron entre 0.45 y 0.94 µg/µl (media = 0.62 µg/µl) para *L. speciosa* y entre 0.20 y 0.89 µg/µl (media = 0.41 µg/µl) para *C. aurantiaca*. El análisis electroforético confirmó la presencia de DNA de alto peso molecular con una excelente integridad estructural. Las bandas aparecieron en la parte superior del gel, sin signos visibles de degradación, lo que indica que las muestras eran adecuadas para la amplificación posterior mediante PCR.

Los 16 cebadores evaluados produjeron 188 bandas amplificadas. Cabe destacar que los cebadores OPA-02 y OPA-11 produjeron el mayor número de fragmentos, 15 y 16, respectivamente. El polimorfismo medio fue del 20.74 % para *L. speciosa* y del 23.94 % para *C. aurantiaca*, mientras que las bandas monomórficas representaron el 79.26 % y el 76.06 % de los perfiles, respectivamente (Tabla 5; Figura 3, cebador OPA-10). Estos resultados indican una alta estabilidad genética en ambas especies. Nuestros hallazgos coinciden con los de Li *et al.* (2002) para *Paphiopedilum micranthum*, en los que se observó un grado significativo de uniformidad genética dentro de las poblaciones, lo que sugiere que el protocolo de micropropagación preserva la integridad del genotipo del donante.

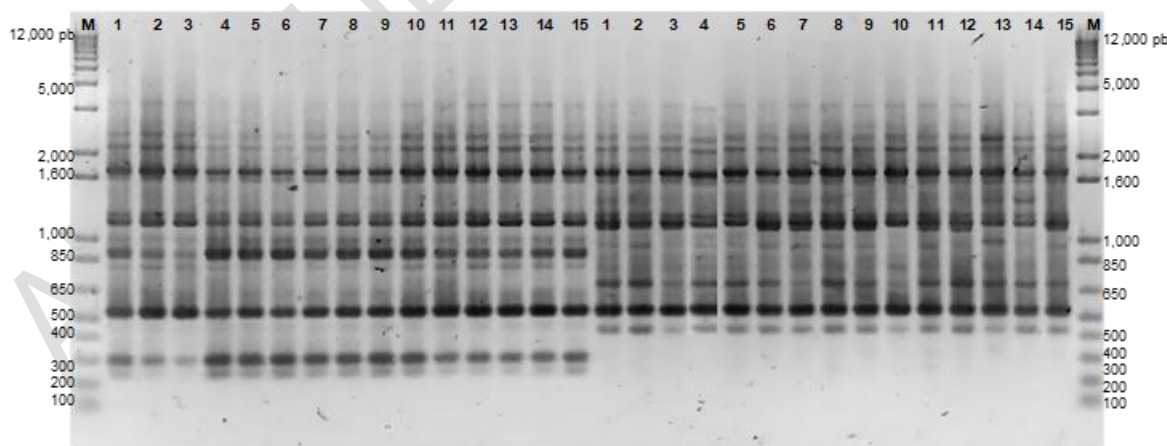


Figura 3. Patrones RAPD generados con el cebador OPA 10.

El uso de RAPD ha permitido detectar polimorfismos de DNA en diversas especies de orquídeas (Tran *et al.*, 2022). En este estudio, los patrones de bandas monomórficas indicaron una uniformidad genética del 76 % al 79 % entre los clones in vitro de *L. speciosa* y *C. aurantiaca*. Estos hallazgos respaldan los de Alkhayri *et al.* (2022), quienes señalaron que los marcadores RAPD son muy eficaces para identificar la variación genética debido a sus perfiles polimórficos distintivos. En consecuencia, la huella genética basada en el DNA ha demostrado ser un método fiable, rápido y preciso para evaluar la variación interespecífica e intraespecífica en las orquídeas (Shan *et al.*, 2002).

A partir de las pruebas anteriores, se confirma que los marcadores RAPD son muy informativos y producen índices de similitud comparables a los observados en la orquídea joya (*Ludisia discolor*) (Tran *et al.*, 2022). Por lo tanto, estos marcadores siguen siendo esenciales para la clasificación, la conservación y la mejora genética de las especies de orquídeas. Debido a que detectan numerosos polimorfismos, los RAPD se han utilizado para analizar la estructura genética de las orquídeas endémicas de Papúa, lo que ha permitido una clara diferenciación a nivel de género (Abbas *et al.*, 2017). Además, estas herramientas moleculares son cruciales para verificar la estabilidad genética de las plantas regeneradas in vitro, como se ha demostrado en las plantas madre de *Macodes limi*, una orquídea endémica de Sabah, Malasia (David *et al.*, 2022).

ARTÍCULO EN PREPARACIÓN

Tabla 5. Análisis de marcadores tipo RAPD en *L. speciosa* y *C. aurantiaca*.

Cebador	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Total del de productos amplificados	Número de bandas				Porcentaje			
			Polimorfismo		Monomorfismo		Polimorfismo		Monomorfismo	
			<i>L. speciosa</i>	<i>C. aurantiaca</i>	<i>L. speciosa</i>	<i>C. aurantiaca</i>	<i>L. speciosa</i>	<i>C. aurantiaca</i>	<i>L. speciosa</i>	<i>C. aurantiaca</i>
OPA-01	CAGGCCCTTC	6	0	4	6	2	0.00	66.67	100.00	33.33
OPA-02	TGCCGAGCTG	15	7	5	8	10	46.67	33.33	53.33	66.67
OPA-03	AGTCAGCCAC	9	4	0	5	9	44.44	0.00	55.56	100.00
OPA-04	AATCGGGCTG	10	2	5	8	5	20.00	50.00	80.00	50.00
OPA-05	AGGGGTCTTG	13	1	4	12	9	7.69	30.77	92.31	69.23
OPA-07	GAAACGGGTG	13	3	2	10	11	23.08	15.38	76.92	84.62
OPA-08	GTGACGTAGG	14	1	3	13	11	7.14	21.43	92.86	78.57
OPA-09	GGGTAACGCC	10	0	0	10	10	0.00	0.00	100.00	100.00
OPA-10	GTGATCGCAG	15	3	0	12	15	20.00	0.00	80.00	100.00
OPA-11	CAATCGCCGT	16	7	9	9	7	43.75	56.25	56.25	43.75
OPA-13	CAGCACCCAC	12	0	0	12	12	0.00	0.00	100.00	100.00
OPA-14	TCTGTGCTGG	9	1	0	8	9	11.11	0.00	88.89	100.00
OPA-17	GACCGCTTGT	8	1	4	7	4	12.50	50	87.50	50.00
OPA-18	AGGTGACCGT	12	2	5	10	7	16.67	41.67	83.33	58.33
OPA-19	CAAACGTCGG	12	4	4	8	8	33.33	33.33	66.67	67.67
OPA-20	GTTGCGATCA	14	3	0	11	14	21.43	0	78.57	100.00
Totales		188	39	45	149	143	20.74	23.94	79.26	76.06

Análisis de conglomerados. El dendrograma se generó mediante el método de agrupamiento jerárquico UPGMA. La figura 4 muestra las relaciones genéticas basadas en el coeficiente de similitud. Según la matriz de similitud, los valores cercanos a 1,00 indican una mayor similitud genética entre las muestras. Con un umbral de similitud de 0,86, el dendrograma se dividió claramente en dos grupos principales. El grupo I, incluye las muestras de *C. aurantiaca*, con valores de similitud que oscilaron entre 0,86 y 0,99; aunque se trata de la misma especie, se observó una divergencia genética de 0,13. En el caso de *L. speciosa*, los valores de similitud oscilaron entre 0,89 y 0,99, con una diferencia de 0,10. Estos resultados concuerdan con los de Yuhanna *et al.* (2021), quienes destacan que los dendrogramas basados en RAPD son fundamentales para distinguir las diferencias genéticas en orquídeas con variaciones morfológicas sutiles o ambiguas.

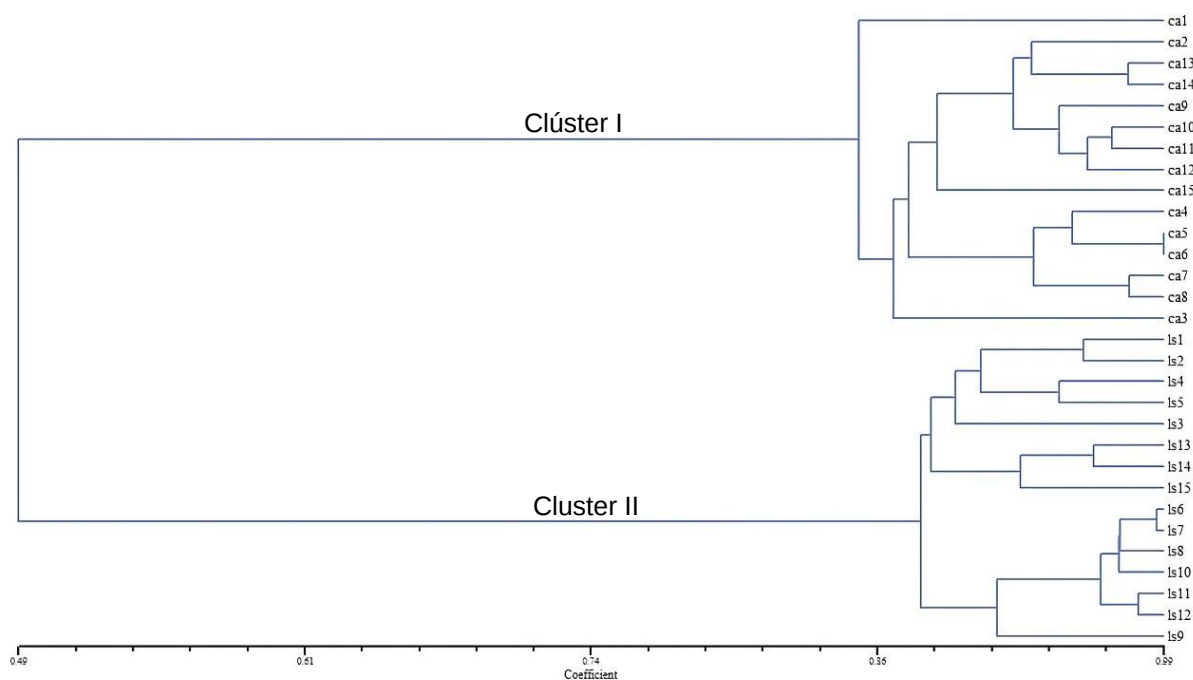


Figura 4. Dendrograma construido con el coeficiente de similitud de Jaccard (1908) de acuerdo a los patrones de bandeo RAPD para *C. aurantiaca* y *L. speciosa*. ca: *C. aurantiaca*, ls: *L. speciosa*.

Hartati *et al.* (2023) obtuvieron resultados similares al utilizar el análisis RAPD para distinguir claramente entre los padres y los híbridos de *Coelogyne pandurata* y *C. rumphii*, un patrón que también se observó en *Dendrobium* (Choopeng *et al.*, 2019). Estos hallazgos confirman que los marcadores RAPD tienen suficiente poder discriminatorio para distinguir las especies de orquídeas silvestres de los híbridos, ya que producen patrones de bandas distintos. Aunque en esta fase no se midieron explícitamente los rasgos morfológicos y fisiológicos, el dendrograma resultante mostró agrupaciones totalmente coherentes con las clasificaciones taxonómicas existentes. Por lo tanto, el enfoque molecular empleado aquí es una herramienta fiable para identificar y clasificar otros géneros de orquídeas.

Desde el punto de vista agrícola, estos hallazgos son esenciales para mantener la uniformidad genética en las poblaciones y prevenir la erosión genética. Los programas de mejoramiento vegetal dependen de poblaciones con alta similitud genética como base para una selección parental eficaz (Hartati *et al.*, 2023). Por lo tanto, la evaluación de la diversidad genética tiene un doble propósito:

identificar y conservar las especies a largo plazo. Los resultados de este estudio contribuyen de manera significativa a la preservación del germoplasma de las orquídeas y ofrecen un marco fiable para futuros esfuerzos de mejora genética (Tran *et al.*, 2022).

Por el contrario, las técnicas de identificación genética basadas en marcadores RAPD proporcionan un medio fiable para evaluar tanto la variación genética como la uniformidad clonal. Este estudio complementa el trabajo de Castellanos *et al.* (2023), cuyo objetivo era diferenciar los géneros *Laelia* Lindl. y *Cattleya* Lindl. mediante análisis morfológicos. Además, nuestros hallazgos proporcionan opciones prácticas para la conservación de las orquídeas autóctonas, en consonancia con los esfuerzos de Medina *et al.* (2023), quienes utilizaron técnicas de criopreservación para rescatar *L. speciosa*. La combinación de herramientas moleculares con estos métodos de conservación refuerza el marco para la protección del germoplasma de orquídeas amenazadas.

Este estudio mejora significativamente las técnicas de cultivo *in vitro*, demostrando que es una estrategia eficaz para aumentar las tasas de germinación y supervivencia, al tiempo que preserva la diversidad genética. Tal y como destacan Pujasatria *et al.* (2020), la composición exacta del medio de cultivo es un factor crucial para que las semillas viables germinen y se desarrollen hasta convertirse en plantas completas y funcionales. Nuestros hallazgos proporcionan un marco estandarizado para la propagación y conservación a gran escala de estas especies de orquídeas.

Conclusiones

Los resultados de este estudio establecen un protocolo fiable y reproducible para el cultivo y la propagación *in vitro* de *L. speciosa*. El medio basal Murashige y Skoog (MS) resultó adecuado para la especie. En concreto, los tratamientos 3 y 6, caracterizados por la adición de benciladenina, vitaminas WS y extracto de malta, mejoraron significativamente la germinación y la inducción de brotes. Además, el tratamiento 2 (una mezcla de tezontle rojo y turba) se identificó como el mejor sustrato para la etapa de aclimatación, lo que se tradujo en una alta supervivencia de las plántulas y un crecimiento saludable. Estos resultados proporcionan una base sólida para la conservación y el uso sostenible de esta orquídea endémica.

El protocolo de extracción de DNA produjo de manera consistente material genómico de alta calidad, lo que permitió una amplificación exitosa por PCR con 16 cebadores de la serie OPA. El dendrograma resultante distinguió con claridad y fiabilidad *L. speciosa* de *C. aurantiaca*, lo que evidencia una separación taxonómica bien establecida. Estos hallazgos subrayan la importancia de los programas de conservación que aplican estrategias integradas que combinan el cultivo *in vitro* —fundamental para especies con necesidades de germinación complejas— con la caracterización molecular. Este estudio ofrece información importante y herramientas emergentes para la gestión y el rescate de especies de orquídeas en áreas de conservación prioritarias.

Contribución de los autores

“Conceptualización del trabajo, C.M.M., J.L.R.O., J.P.L.S., J.M.S.; desarrollo de las metodologías, J.L.R.O., J.P.L.S., J.M.S.; validación experimental, C.M.M.; manejo de software, C.M.M., J.L.R.O., J.P.L.S.; manejo de datos y análisis de resultados, C.M.M., J.L.R.O., J.P.L.S., J.M.S.; redacción, revisión y edición, C.M.M., J.L.R.O., J.P.L.S., J.M.S.; adquisición de fondos, C.M.M., J.L.R.O., J.P.L.S.; preparación del manuscrito, C.M.M., J.L.R.O., J.P.L.S., J.M.S.”

“Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo”

Financiamiento

"Esta investigación fue financiada con fondos propios".

Declaraciones éticas

No aplica.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Orquidario Dr. y Gral. Alberto Oviedo Mota, ubicado en Morelia, Michoacán de Ocampo, por proporcionar las semillas de las orquídeas empleadas en la elaboración del estudio.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Referencias

- Abbas, B., Dailami, M., & Listyorini, F. M. (2017). Genetic variations and relationships of Papua's endemic orchids based on RAPD markers. *Natural Science*, 9(11), 377–385. <https://doi.org/10.4236/ns.2017.911035>
- Aguilar, M. M. A., & López, E. A. L. (2013). Germinación in vitro de *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr., una herramienta para su conservación ex situ. En estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas; Pulido, F. G., Monks, S. Eds.; Zea Books: Lincoln, NE, USA. 2, 18–24. <https://digitalcommons.unl.edu/hidalgo/5>
- Alkhayri, J. M., Mahdy, E. M. B., Taha, H. S. A., Eldomiaty, A. S., Abd, E. M. A., Latef, A. A. H. A., Rezk, A. A., Shehata, W. F., Almaghasla, M. I., Shalaby, T. A., Sattar, M. N., Ghazzawy, H. S., Awad, M. F., Alali, K. M., Jain, S. M., & Hassanin, A. A. (2022). Genetic and morphological diversity assessment of five kalanchoe genotypes by SCot, ISSR, and RAPD-PCR markers. *Plants*, 11(13), 1722–1734. <https://doi.org/10.3390/plants11131722>
- Ávila, D. I., Oyama, K., Gómez, A. C., & Salgado, G. (2009). In vitro propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. *Plant cell tissue culture*, 99, 335–33. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9609-8>
- Ávila-Díaz, I. (2007) Biología de poblaciones de *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. (Orchidaceae) para su manejo y conservación. Ph.D. Tesis, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México. <https://ru.dgb.unam.mx/items/a6c6a546-2fef-4fd0-83e6-245e8b3d8162>
- Balilashaki, K., Zakizadeh, H., Olfati, J. A., & Soorni, A. (2024). The evaluation of genetic diversity among five Phalaenopsis species using IRAP and RAPD molecular markers. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 55(1). <https://doi.org/10.22059/ijhs.2023.343479.2030>
- Cardoso, J. C., Zanello, C. A., & Chen, J. T. (2020). An overview of orchid protocorm-like bodies: Mass propagation, biotechnology, molecular aspects, and breeding. *International Journal of Molecular Science*, 1(985). <https://doi.org/10.3390/ijms21030985>

- Castellanos, R. M., Rosas, U., Guzmán, R. M. C., & Sandoval, Z. E. (2023). Contribution of morphoanatomic characters to the taxonomy of the genus *Laelia* (Orchidaceae) in Mexico and their implication in environmental adaptation. *Plants*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/plants12051089>
- Choopeng, S., Te-chato, S., & Khawnium, T. (2019). The use of RAPD markers for the verification of *Dendrobium* hybrids. *International Journal of Agricultural Technology*, 15 (3), 399–408. <https://li04.tci-thaijo.org/index.php/IJAT/article/view/8227>
- David, D., Rusdi, N. A., Mohd Mokhtar, R. A., Mohd Faik, A. A. M., & Gansau, J. A. (2022). Establishment of *in vitro* regeneration protocol for Sabah's Jewel Orchid, *Macodes limii* J.J. Wood & A.L. Lamb. *Horticulturae*, 8(2), 155. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8020155>
- Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: versión 2. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1, 19–22. <https://doi.org/10.1007/BF02712670>
- Erzurumlu, G. S., Sultana, N., Vural, M., & Serce, S. (2018). Genetic and phenotypic variation among Turkish terrestrial orchid species as revealed by RAPD and morphological characteristics. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 42(4), 227–236. <https://doi.org/10.3906/tar-1711-37>
- Flores, T. M., García, V. R., Sáenz, R., C., Á., D. I., P., H., & López, T. L. (2020). Distribution and conservation of species is misestimated if biotic interactions are ignored: the case of the orchid *Laelia speciosa*. *Scientific Reports*, 10, 9542. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63638-9>
- Hartati S., Samanhudi, A., & Cahyono, O. (2023). Genetic similarity among *Dendrobium* species from Indonesia using RAPD markers. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. Vol. 24 No. 9: 515-521. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d240945>
- Hon, Y. K., Yong, C. S. Y., Abdullah, J. O., & Go, R. (2020). Development of species-specific SCAR markers for identification and authentication of three rare Peninsular Malaysian endemic *Coelogyne* (Orchidaceae) orchids. *F1000Research*, 9, 1–14. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.26170.2>
- Jaccard, P. (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société vaudoise des sciences naturelles*, 44(163), 23–270. <https://doi.org/10.5169/seals-268384>
- Kumar, M., Chaudhary, V., Sirohi, U., Singh, M. K., Malik, S., & Naresh, R. K. (2018). Biochemical and molecular markers for characterization of chrysanthemum germplasm: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(5), 2641–2652. <https://www.phytojournal.com/archives/view-pdf/5956/7-5-348>
- Lee, E. H. E., Laguna, C. A., Murguía, G. J., Elorza, M. P., Iglesias, A. L. G., García, R. B., Barredo, P. F. A., & Santana, B. N. (2007). Regeneración *in vitro* de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*. *Revista Científica UDO Agrícola*, 7, 58–67. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:85784940>
- Li, A., Luo, Y., & Ge, S. (2002). A Preliminary study on conservation genetics of an endangered orchid (*Paphiopedilum micranthum*) from southwestern China. *Biochemical Genetics*, 40 (5-6), 195–201. <https://doi.org/10.1023/a:1015888226416>

- Li, C., Dong, N., Zhao, Y., Wu, S., Liu, Z., & Zhai, J. (2021). A review for the breeding of orchids: Current achievements and prospects. *Horticultural Plant Journal*, 7(5), 380-392. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2021.02.006>
- Mayo, M. A., García, H. E., Noguera, S. E., Cetzal, I. W., & Alatorre, C. F. (2022). Advances in breeding, bioprospecting, and *in vitro* culture of *Laelia* orchid species. *Horticulturae*, 8(2), 103. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8020103>
- Mayo, M. A., Maceda, L. L. F., Andrade, C. S. B., Noguera, S. E., Caamal, V. H., Cano, S. J. S., & Alatorre, C. F. (2020). Efficient protocol for *in vitro* propagation of *Laelia rubescens* Lindl. from asymbiotic seed germination. *South African Journal of Botany*, 133, 264-272. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8020103>
- Medina, M. C., Rodríguez, O. J. L., & Mendoza, T. Y. (2023). Crioconservación de *Laelia speciosa* en peligro de extinción. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 11(Especial), 100-104. <https://doi.org/10.29057/icbi.v11iEspecial.10183>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Mursyidin, D. H., Rubiansyah, M., & Badruzsaufari. B. (2022). Genetic relationship of several morphological and molecular characteristics of *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume orchids from the Meratus Mountains of South Kalimantan, Indonesia. *Indonesian Journal of Forestry Research*, 9(1), 63-72. <https://doi.org/10.20886/ijfr.2022.9.1.63-72>
- NOM-059-SEMARNAT-2010, Norma Oficial Mexicana. (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. <https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4254/semarnat/semarnat.htm>
- Ortega, L. M. M., Salgado, G. R., Gómez, A. C., & Ávila, D. I. (2011). Acclimatization of the endangered Mexican epiphytic orchid, *Laelia speciosa* (H.B.K.) SCHLTR. *European Journal of Environmental Sciences*, 1(2), 48-54. <https://doi.org/10.14712/23361964.2015.46>
- Pujasatria, G. C., Miura, C., & Kaminaka, H. (2020). *In vitro* symbiotic germination: a revitalized heuristic approach for orchid species conservation. *Plants*, 9, 1742. <https://doi.org/10.3390/plants9121742>
- Sarabia, O. M. E., Ávila, D. I., Carlos, G. A., & Salgado, G. R. (2010). Callus growth and plant regeneration in *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *Lankesteriana*, 10, 13-18. <https://hdl.handle.net/20.500.14330/PER01000327404>
- Shan, X. C., Liew, E. C. Y., W., M. A., & Hodgkiss, I. J. (2002). Characterization and taxonomic placement of Rhizoctonia-like endophytes from orchid roots. *Mycologia*, 94(2), 230-239. <https://doi.org/10.1080/15572536.2003.11833228>
- Sheena, M. (2000). Manual para la germinación *in vitro* de orquídeas. Ceiba Foundation for Tropical Conservation, 17 p. https://blog.solusan.com/wp-content/uploads/2007/05/germinacion_orquideas.pdf

- Tran, T. K. P., Pham, M. H., Trinh, T. H., & Widiarsih, S. (2022). Investigation of the genetic diversity of jewel orchid in Vietnam using RAPD and ISSR markers. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23(9). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d230950>
- Wetmore, R. H., & Sorokin, S. (1955). On the differentiation of xylem. *Journal of the Arnold Arboretum*, 36, 305–317. <https://dn760003.eu.archive.org/0/items/biostor-177437/biostor-177437.pdf>
- Yuhanna, W. L., Hartati, S., & Sugiyarto, M. (2021). Genetic variability of *Phaius* and *Dendrobium* orchids based on molecular markers. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 637 (1), 012036. <https://doi.org/10.1088/17551315/637/1/012036>

ARTÍCULO EN PRENSA