

167
2 ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO IN VITRO DE ORQUIDEAS MEXICANAS
EN PELIGRO DE EXTINCION

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
PRESENTA
MARA CAROLINA RAMIREZ FUENTES

MEXICO, D.F.

1990.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE
MEXICO





UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

Las múltiples e intensas actividades de la cada vez mayor población humana incrementan cada día sus demandas de recursos vegetales. El creciente consumo y problemas socioeconómicos han excedido la capacidad del hombre para extraer de una manera racional y segura los bienes y servicios de la naturaleza (Wilson, 1984). Los estragos causados por enfermedades, plagas, incendios, contaminación, expansión agrícola y ganadera sobrecolectas ilegales y políticas inadecuadas de uso y preservación de la vida silvestre han ocasionado serias amenazas de extinción para especies de valor económico actual y potencial que podrían satisfacer necesidades básicas de la sociedad presente y futura. Esta tendencia ha alterado todos los ecosistemas naturales con resultados que ponen en peligro a todas las formas de vida de nuestro planeta (NAS, 1975; Osborne y van Staden, 1987; Janzen, citado por Linden, 1989; Vovides, 1989). En la actualidad, la velocidad con que está desapareciendo germoplasma en su mayoría desconocido por las sociedades que viven en las ciudades es realmente alarmante, la FAO (1976, citado por Simmons, 1976) estima que en las regiones tropicales del mundo, donde existen dos tercios de las plantas llamadas superiores (ca. 185,000 especies) cada minuto que pasa se destruyen 21.9 ha de sus bosques. En 1986 la IUCN estimó que 60,000 especies vegetales (una cuarta parte de la diversidad genética vegetal) se habrá extinguido al llegar el año 2050 (Raven, 1986). De no resolver este

problema y aplicar soluciones, es posible que se pierdan numerosos beneficios ecológicos, fuentes de alimentos, de nuevas medicinas y de otros usos industriales. Entre las especies en mayor peligro de desaparecer de sus habitats, debido a la destrucción de éstos y a la sobrecolecta se encuentran todas las cactáceas, las cícadas y las orquídeas, las cuales han sido incluídas en los Apéndices I y II del CITES (Collins, 1987).

El presente trabajo tuvo como objetivos establecer las condiciones de cultivo in vitro para lograr la germinación asimbiótica de semillas de las especies de orquídeas mexicanas: Encyclia vitellina, Mormodes badia y M. rosilloana, así como inducir la regeneración de plántulas vía embriogénesis somática a partir de protocormos cigóticos; y el crecimiento de yemas axilares.

Semillas de dichas especies se cultivaron en medios Vacin / Went, Knudson C (KC) y KC modificado con hidrolizado de caseína y glutamina, así como con 2, 2.5 y 3% de sacarosa, lográndose la germinación de las dos primeras especies en KC+vitaminas B5+2.5% sacarosa, y para M. rosilloana hubo de incluirse glutamina. Los resultados demostraron diferencias asociadas a los distintos factores del medio de cultivo y a las condiciones de iluminación y temperatura. Las semillas de E. vitellina germinaron en oscuridad, manifestándose como fotoblásticas negativas, en tanto que en Mormodes spp. lo hicieron en luz. Para las tres especies el régimen de temperatura más propicio fué de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

En las 3 especies fué posible inducir la morfogénesis vía embriogénesis somática (PLBs): En E. vitellina en medio KC+vit B5+ 2.5% sac; M. badia KC+vit B5+BA 5 μ M+ ANA 0.1 μ M+ Glu 15 mg/litro; M. rosilloana KC+vit B5+Glu 15 mg/litro. Nudos cultivados in vitro de M. badia permitieron la propagación clonal de esta especie en el medio de germinación adicionado de BA 5 μ M + ANA 0.1 μ M, en estas condiciones y los períodos de incubación permitieron romper la dominancia apical y promover el desarrollo de las yemas axilares.

Plántulas de las 3 especies se mantienen in vitro como lotes de la colección de germoplasma del Jardín Botánico de la UNAM.

INTRODUCCION

El territorio mexicano tiene aproximadamente 2,000,000 Km² y es muy diverso en climas, topografía y geología, además de que se encuentra entre los 30° y los 15° de latitud norte, lo cual lo sitúa en el extremo del trópico y permite que el país presente una flora muy diversa. Debido a esto cuenta con amplias posibilidades ecológicas; así México es un país de mosaicos y contrastes que posee una riqueza vegetal única.

Aquí se reúnen 3 geofloras; holártica, autóctona y neotropical. La mezcla de esas floras en el pasado debe de haber contribuido en gran medida a la riqueza de la flora mexicana presente (Vovides y Gómez-Pompa, 1977; Toledo, 1988). Se considera que con sus más de 30,000 especies de plantas vasculares, México tiene una flora más vasta que la de U.R.S.S. y del mismo orden que la de Estados Unidos y Canadá juntos. Por esta razón el territorio del país, en particular su mitad meridional, se considera una de las zonas florísticamente más ricas del mundo (Toledo, 1988; Vovides, 1989).

Por desgracia la misma notoriedad que el país alcanza en cuanto a su potencial florístico también lo distingue en cuanto al ritmo de destrucción del mismo. Como consecuencia de múltiples actividades humanas como talas inmoderadas, fuegos incontrolados, contaminación creciente, sobrepastoreo y la ampliación muchas veces injustificada de la frontera agrícola y ganadera que

amenaza con dejar a la nación sin su cubierta vegetal. Se estima que el 95% de las selvas tropicales del país han desaparecido y que la destrucción de los bosques sigue un ritmo de varios cientos de miles de hectáreas al año, según datos oficiales serían unas 500,000 sin embargo, Toledo (1988) señala que conservadoramente si se consideran las cifras por desmontes para la agricultura y ganadería se rebasa fácilmente 1,000,000 de ha/año. Se ha señalado que hoy en día, la destrucción de áreas naturales en los trópicos es un síntoma de problemas socioeconómicos graves como son el crecimiento de la población y el abasto deficiente de alimentos. Para resolver permanentemente el problema de la conservación de recursos naturales es necesario resolver paralelamente estos dos problemas. Se han tomado medidas adicionales como la creación de áreas naturales protegidas, pero estas no constituyen una solución permanente. Las reservas se pretenden conservar para que sirvan a manera de banco de germoplasma y asegurar la diversidad y continuidad genética de especies de plantas y animales; además de proporcionar áreas para la investigación en Ecología y contar con los programas para el manejo eficiente de los recursos naturales, enseñando a los residentes el principio de la utilización sostenida de dichos recursos y como pueden mejorar el uso de la tierra (Vovides y Gómez-Pompa, 1977). No obstante, es posible que los sistemas tradicionales de la gente nativa de cada región sean menos dañinos a la naturaleza y más

eficientes en cuanto a productividad de alimentos considerando sus limitados recursos tecnológicos.

El gobierno de México ha legislado sobre la utilización de plantas silvestres y decretó algunas áreas: comunidades vegetales protegidas. Desgraciadamente estas medidas han resultado ser limitadas e ineficientes y los problemas persisten en proporciones aún mayores (Toledo, 1988). No todas las comunidades han sido afectadas en la misma intensidad, algunas han decrecido más que otras. Entre las más afectadas se encuentran los bosques tropicales lluviosos, los encinares y los bosques de neblina. Desafortunadamente estas comunidades son las más ricas en especies animales y vegetales (Simmons, 1976; Wilson, 1989).

Uno de los grupos de plantas que se ha visto sumamente afectado por estos problemas es la familia Orchidaceae (Collins, 1987), que cuenta en nuestro país con un considerable número de especies que se encuentran amenazadas por la destrucción de su hábitat y la sobrecolecta. Estos son los dos factores principales para que las orquídeas se vean amenazadas, una es la sobrecolecta comercial que ha disminuido considerablemente las poblaciones silvestres de especies de interés hortícola especialmente cuando--éstas son raras, son colectadas hasta el grado que se está provocando su extinción en la localidad con el fin de comercializarlas en el mercado nacional e internacional. La segunda es la destrucción del hábitat, en la cual

numerosas especies de orquídeas perecen al modificarse las condiciones naturales. La mayoría de las especies de orquídeas son epifitas, por lo que son las más amenazadas, es posible encontrar una gran número de especies de orquídeas creciendo en un sólo árbol y es difícil encontrar un árbol que soporte exactamente las mismas especies; de esta forma son las más amenazadas por leñadores (Kopowitz y Stone, 1984; Hágsater, 1987).

De hecho la destrucción del habitat es la amenaza más seria para las epifitas. El número de especies vegetales provenientes de los trópicos que ilegalmente se comercializan es menor al número destruido por las operaciones de tala de bosques y selvas, es difícil calcular cuantas plantas mueren por cada árbol que cae considerando que algunos de estos árboles soportan cientos de plantas. Los individuos que sobreviven a estas talas son frecuentemente desecados por el sol debido a que se ha modificado su habitat (Kopowitz y Stone, 1984).

Además de la enorme destrucción de las poblaciones establecidas, en la naturaleza la propagación de orquídeas a partir de semilla es lenta y está sujeta a múltiples amenazas. Por su tamaño y peso las semillas pueden ser desplazadas por el viento o el agua y pueden terminar casi en cualquier parte, de estas, sólo un número encuentra las condiciones adecuadas para germinar y si sobreviven posteriormente requieren muchos años para desarrollar una planta, madurar y llegar a florecer, durante los primeros años la planta es particularmente

vulnerable a factores físicos del medio y a ser depredada por algún animal, por ejemplo: pájaros pequeños, insectos, caracoles, etc., si la planta sobrevive a todos esos obstáculos la posibilidad de que el polinizador adecuado la encuentre y la polinice durante la época de floración es considerablemente reducida (Kopowitz y Stone, 1984).

Las orquídeas han desarrollado múltiples mecanismos de atracción que permiten a los insectos polinizadores transportar hasta el estigma, el polen el cual es producido en paquetes llamados polinios que se adhieren a sus cuerpos, de esta forma se garantiza que se produzca el máximo número de semillas o que estas no se produzcan. Por lo cual los cambios ecológicos que afectan a los insectos y por ende a la polinización pueden significar cambios en las poblaciones de estas especies vegetales (Kopowitz y Stone, 1984).

Algunas especies son muy raras y amenazadas en la naturaleza pero son muy comunes en cultivo por ejemplo *Cattleya skinneri* que en estado silvestre está extinta en Costa Rica pero es posible obtenerla ya que se reproduce vegetativamente a partir de ejemplares pertenecientes a coleccionistas particulares (Kopowitz y Stone, 1984).

Intentar hacer un inventario de las especie amenazadas y en peligro de extinción, es una tarea complicada, ya que el inventario de la flora de México dista mucho de estar terminado aún. Se cuentan con

algunas floras regionales pero esto no permite evaluar con precisión el estado actual en que se encuentran estas plantas. A esto se auna la ininterrumpida destrucción de habitats (Vovides y Gómez-Pompa, 1977). Si consideramos válida la cifra de deforestación de 500,000 ha/año representa la destrucción de una hectárea de bosque cada minuto, con lo que en México ocurre el 5% de la destrucción mundial de recursos naturales cada minuto (Vovides, 1989).

El número de especies confirmadas de orquídeas en el país es poco más de 900, sin embargo se conocen al menos 200 especies más en espera de ser determinadas o descritas. A esta estimación deberán añadirse otros muchos taxa que aparecieran en las regiones poco estudiadas del país como: Chiapas y Guerrero. Es evidente que si no se ha podido realizar un inventario con una cobertura más o menos buena es aún más difícil decir algo acerca de su distribución, aspectos ecológicos o el estado actual de las poblaciones de todas las especies. A pesar de esto es posible advertir cuales son los taxa que se encuentran en un estado crítico.

Una de las clasificaciones de categorías de riesgo más utilizadas es la de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (International Unit for Conservation of Nature and Natural Resources, IUCN), la cual es la siguiente (Lucas y Synge, 1978).

EXTINTAS (Ex)

Esta categoría sólo se usa para especies que se conoce que no existen en el campo después de repetidas búsquedas en las localidades tipo y en otras en las que se encontraba o en lugares semejantes. Además se incluyen especies que están extintas en el campo pero sobreviven en cultivo;

EN PELIGRO DE EXTINCION (E)

Se trata de taxa en peligro de desaparecer, y cuya sobrevivencia es poco probable si continúan operando los factores causales. Se incluyen taxa cuyos números de individuos han sido reducidos a un nivel crítico o aquellos cuyos hábitats han sido tan drásticamente reducidos que podemos juzgar que ahora están en inminente peligro de extinción.

VULNERABLES (V)

Taxa que se cree podrían pasar a la categoría anterior en un futuro cercano si los factores causales continúan operando. Se incluyen taxa en los que la mayoría de las poblaciones decrece debido a la sobrexplotación, la destrucción extensiva del hábitat u otros tipos de perturbación; taxa cuyas poblaciones han sido seriamente disminuidas y aquellos cuya seguridad posterior no ha sido asegurada; y también taxa con poblaciones que son todavía numerosas pero que están bajo amenaza de factores adversos serios a lo largo de su área de distribución.

RARAS (R)

Taxa con pequeñas poblaciones que en la actualidad no están en peligro, ni son vulnerables, pero corren ese riesgo. Estos taxa generalmente están muy localizados dentro de áreas geográficas o hábitats muy restringidos o se encuentran distribuidos en densidades muy bajas a través de su área de distribución.

En base a esta clasificación se ha elaborado un listado preliminar de los taxa de orquídeas mexicanas amenazadas .

La IUCN a través del Grupo de Especialistas en Orquídeas, ha hecho algunas recomendaciones para poder conservar estas plantas. Es indudable que lo más importante es la protección de las áreas donde las orquídeas habitan y deberá darse mayor impulso a la conservación de ambientes con gran diversidad de especies o alta incidencia de endemismos. En México existen áreas de gran interés que deberían ser conservadas. Algunas están en proceso o han sido recientemente declaradas como áreas protegidas entre ellas: Sian Ka'an en Quintana Roo, la Sierra de Manantlán en Jalisco, el Cerro Huitepec y el Triunfo en Chiapas, Omiltemi en Guerrero (Hágsater, 1987; Toledo, 1988).

Además un aspecto que debe destacarse es que las orquídeas, aún aquellas en peligro de extinción son un recurso susceptible de ser manejado y aprovechado ya que su cultivo, en muchos caso, es económicamente rentable.

Especímenes de alta calidad hortícola propagados artificialmente disminuirían las presiones de colecta sobre las poblaciones naturales. Técnicas de propagación por cultivo de tejidos como la germinación in vitro y la clonación a partir de estructuras somáticas permiten regenerar enormes cantidades de plantas (George y Sherrington, 1984).

La aplicación de las técnicas de cultivo in vitro a la industria de las orquídeas ha permitido la producción de plantas de calidad en grandes cantidades y el establecimiento de híbridos comercializando flor cortada y plantas. Esta industria está distribuida mundialmente logrando grandes volúmenes de producción. Rao en 1977 reportó que la producción anual de Francia se estimó que fluctuaba entre \$800,000 a 1,000,000 de dolares (US), la producción de Singapur rebasaba los \$5,000,000 de dólares (US), para Tailandia se reportaron \$6,500,000 dolares (US), Suiza \$1,000,000 dólares (US) y para California en Estados Unidos la producción alcanzaba un valor aproximado de \$10,000,000 de dolares. Esta tecnología se empieza a aplicar en nuestro país, industrialmente y si se enfoca al comercio regulado de plantas contribuirá a la protección de las especies vegetales.

El coleccionar plantas en peligro de extinción a fin de cultivarlas y propagarlas en Jardines Botánicos tiene como objetivo, en un futuro cercano, que las plantas raras y en peligro puedan ser reintroducidas en habitats

adecuadamente protegidos, que hayan sido asignados como reservas o parques nacionales .

Como parte de un programa amplio de rescate de especies en peligro de extinción que se lleva a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (ahora de Biotecnología Vegetal y Genética) del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBUNAM) se seleccionaron 3 especies de orquídeas mexicanas, amenazadas, para establecer las condiciones de su cultivo in vitro metodología que ha demostrado su eficiencia para cumplir con el cometido final de regenerar plantas y reintroducir poblaciones de orquídeas en extinción a su habitat (Chávez, 1980; Rubluo et al, 1989).

Las especies seleccionadas para desarrollar este trabajo fueron:

a) *Encyclia vitellina* Dressler. Es una especie vulnerable que ha sido sobrecolectada por más de 150 años, tiene una importancia hortícola considerable por su demanda en el extranjero y en el mercado nacional. Un gran número de poblaciones han desaparecido debido a esta sobrecolecta (Salazar, 1989 comunicación personal).

b) *Mormodes badia* Rolfe. Se considera una especie rara ya que tiene una distribución restringida, aunque puede ser localmente abundante la distribución de sus poblaciones es sumamente dispersa (Salazar, 1989 comunicación personal).

c) *Mormodes rosilloana* Salazar inédita .Es una especie en peligro de extinción que se descubrió recientemente, proveniente de 2 localidades en Guerrero y el Estado de México donde no ha sido colectada nuevamente, la distribución de sus poblaciones es muy discontinua (Salazar,1989 comunicación personal). Esta especie puede considerarse com un caso dramático (desgraciadamente no único) de una especie que aún antes de ser descrita y estudiada por la Ciencia, se encuentra en serio peligro de extinción, com este caso seguramente hay muchos otros lo cual pone de manifiesto la justificación de todo esfuerzo que tienda a proteger y propagar con eficiencia nuestros recursos naturales que se encuentran amenazados.

II. ANTECEDENTES

II.1 Generalidades de la familia Orchidaceae

La familia Orchidaceae es una de las más grandes y diversas, cuenta con 800 géneros y de 20,000 a 35,000 especies lo que constituye alrededor de una décima parte de todas las especies de plantas superiores. Su distribución es cosmopolita, encontrándose desde el Norte de Suecia y Alaska hasta Tierra del Fuego, es decir, muy cerca de los llamados límites de vegetación.

Se presentan formas terrestres, epifitas, litofíticas semiacuáticas e incluso géneros subterráneos los cuales están restringidos a Australia (Correll, 1950). Las especies terrestres se localizan en zonas templadas y tropicales, mientras que las epifitas están limitadas a ambientes tropicales y subtropicales, como sucede con la mayoría de las familias de plantas vasculares que presentan epifitas (Correll, 1950).

Al igual que otros grupos de plantas, las orquídeas son mucho más diversas en las zonas tropicales y subtropicales, principalmente en habitats con niveles altos de precipitación pluvial y humedad. Dunsterville (1966) encontró al menos 47 especies de orquídeas epifitas en un árbol en Venezuela, en un bosque mesófilo de montaña (Dressler, 1981).

Las orquídeas son plantas perennes con un tipo de crecimiento vegetativo que puede ser: simpodial presente en orquídeas terrestres y algunas epifitas; ó

monopodial presente en la mayoría de las epifitas (Correll, 1950).

Las raíces son cilíndricas, carnosas o tuberosas, muchas especies poseen rizomas de los cuales se originan raíces adventicias, las orquídeas terrestres y epifitas además de algunas especies de Liliaceae y Araceae, presentan raíces adventicias que poseen un desarrollo especial de la epidermis, llamado velamen, tejido esponjoso de varias capas de células muertas, que rápidamente absorbe agua y nutrientes en solución. Las células del velamen pueden contener hongos micorrízicos; el origen de este tejido puede estar relacionado con la simbiosis que generalmente establecen las orquídeas.

Muchas epifitas de hábito simpodial forman pseudobulbos, estos son engrosamientos secundarios de los tallos y presentan uno o varios entrenudos, que funcionan como reservorio de agua y nutrientes. Poseen diferente forma, globosa, piriforme y fusiforme con hojas a lo largo del pseudobulbo o que se originan sólo en la parte apical (Correll, 1950).

Las hojas de las orquídeas son enteras y varían de forma desde una bráctea, como vaina o como una lámina delgada o ancha la cual puede ser desde filiforme hasta orbicular, membranosa o coriácea e incluso carnosa, también puede almacenar agua.

Sus flores pueden ser hermafroditas o unisexuales dependiendo del género, tienen ovario ínfero con 1-3

divisiones, puede ser pequeño e inconspicuo o grande y visible. Los sépalos (3) están generalmente coloreados al igual que los pétalos y pueden estar libres o más o menos unidos o formando un tubo. Generalmente el sépalo dorsal difiere algo en la forma de los sépalos laterales los cuales son mas o menos oblicuos y pueden estar libres uno del otro o adheridos frecuentemente por la base. De los tres pétalos, dos son regulares e idénticos y el tercero llamado labelo es mas o menos modificado. Su posición inferior corresponde al giro del pedicelo, o del pedicelo y del ovario (resupinación), (Correll, 1950). Habitualmente difiere en forma tamaño y coloración de los otros pétalos, la superficie interna frecuentemente está adornada con papilas o lamelas y la base puede ser pequeña o muy amplia formando un nectario. Por su parte la columna representa la unión de los carpelos y es, en cierta forma una prolongación del eje floral. En muchas especies un lóbulo estigmático modificado, llamado rostelo, se proyecta sobre la superficie estigmática que permite adherir los polinios a los insectos. Las anteras situadas atrás permanecen en una cavidad llamada clinandrio, la antera puede estar dividida y contiene de 2 a 8 polinios o masas de polen (Correll, 1950).

El número de semillas que se producen por cápsula es usualmente muy grande y va desde 1,300 hasta 5,000,000 (Arditti, 1967). La estructura y tamaño de las semillas de las orquídeas es una de las más notables

características de la familia Orchidaceae ; son pequeñas que pesan de 0.3 µg a 14 µg (Burgeff, 1936; Harley, 1950 citados por Arditti, 1967) y miden de 0.25 a 1.2mm de largo (Knudson, 1922; HoeneI, 1940, 1949 citados por Arditti, 1967) y de 0.90 a 0.270mm de ancho (White, 1927, 1939; Knudson, 1929; Davis, 1946; Scott y Arditti, 1959; Kupper y Linsmaier, 1961 citados por Arditti, 1967).

La semilla consiste de un pequeño embrión esférico suspendido dentro de una cubierta membranosa , frecuentemente transparente pero también puede estar pigmentada (Arditti, 1967). Asimismo se han reportado semillas diembrónicas y poliembrónicas (Arditti, 1967).

Estructuralmente se distinguen dos grupos de semillas de orquídeas; un pequeño número de especies que poseen embriones relativamente diferenciados incluyendo un cotiledón rudimentario por ejemplo: *Sobralia macrantha*, *Encyclia vitellina* (Burgeff, 1939 ; Harley, 1951 citado por Arditti, 1967; Veyret, 1974).

La gran mayoría de las especies tienen semillas relativamente indiferenciadas, sin cotiledones , ni endospermo y se considera que esta característica corresponde a grupos evolutivamente superiores (Arditti, 1967) .

Los embriones de las orquídeas, a pesar de su condición relativamente indiferenciada, presentan diversos patrones de desarrollo de acuerdo con las características del suspensor, además de otros patrones básicos que son revelados en el curso de la formación del cuerpo embrionario (Veyret, 1974). El embrión mismo consiste de células isodiamétricas, de citoplasma densamente granulado y de núcleo conspicuo, es posible distinguir además dos regiones : la región posterior que consiste de células grandes a veces vacuoladas y la región anterior que está formada de células pequeñas y densas que eventualmente desarrollan al meristemo apical de la plántula (Carlson, 1925; Burgeff, 1936 citados por Arditti, 1967) .

II.2 Germinación

Esta se asemeja mas al desarrollo de una yema que a la germinación de una semilla . El embrión al germinar se hincha y revienta la cubierta de la semilla y se torna en una estructura esférica o de forma cónica , que ha sido denominada estado de protocormo (Bernard, 1909 citado por Arditti, 1967), posteriormente se hace evidente en la parte superior el primer primordio foliar como una pequeña prominencia, aparecen rizoides absorbentes alrededor de la parte basal y el protocormo completo crece en diámetro y se desarrollan las primeras hojas y poco después aparece la primera raíz (Knudson, 1922; Carlson, 1936; Burgeff, 1936; 1959, Curtis, 1943; Poddubnaya-Arnoldi y Selezneva, 1957; Arditti y Bils, 1965 citados por Arditti, 1967).

El proceso natural de germinación en orquídeas requiere de una infección fungal previa que permite el establecimiento de la simbiosis denominada micorriza (Frank, 1892 citado por Arditti, 1967). El significado real de esta relación y su importancia fué reconocida inicialmente por Bernard en 1909. No se ha determinado si la relación hongo-orquídea es específica, pero se ha encontrado que la germinación en condiciones naturales es mas eficiente al ocurrir la infección con hongos provenientes de la planta madre o de plantas de la misma especie (Arditti, 1967).

II.3 Propagación de orquídeas

II.3.1 Métodos tradicionales.

La propagación de orquídeas se realiza mediante: 1) La germinación simbiótica tradicional, partiendo de la infección con hongos aislados de la planta madre o bien sembrando las semillas en el mismo substrato en el que se encuentra ésta, o una planta de la misma especie (Arditti, 1967). 2) La separación de pseudobulbos a fin de multiplicar las plantas originales. Este sistema es muy lento, por lo general cada año se produce un pseudobulbo nuevo y se recomienda dejar por lo menos tres pseudobulbos en cada separación.

II.3.2 Cultivo de Tejidos Vegetales

Los métodos de propagación vegetativa que brindan las técnicas de Cultivo de Tejidos han demostrado una aplicabilidad con un considerable número de especies vegetales (Murashige, 1978). No obstante los procedimientos usados para la propagación in vitro comprenden los siguientes pasos comunes: (1) La selección de un explante adecuado, su desinfección superficial y transferencia a un medio nutritivo (Estado I); (2) La proliferación de yemas en un medio de multiplicación (Estado II) y (3) La transferencia de los brotes a un medio de enraizamiento (o almacenamiento) y

su establecimiento in vivo (Estado III) (Murashige, 1978).

Múltiples factores intervienen en el desarrollo de los cultivos (Murashige, 1974; Rhaghavan y Torrey, 1964) y de la vía morfogénica de regeneración, por ejemplo: la edad fisiológica y la condición sanitaria de la planta madre, el tipo de explante, la estación del año, entre otros, que pueden ser importantes para determinar la respuesta de los cultivos in vitro. Generalmente los explantes se esterilizan superficialmente con soluciones diluidas de hipoclorito de sodio y se enjuagan con agua destilada esterilizada. Una técnica alternativa para obtener directamente explantes en condiciones asépticas es a partir de plantas germinadas in vitro.

La gran mayoría de los órganos de las plantas, tejidos y células son capaces de crecer en un medio que contenga sólo los nutrientes básicos que son transportados por el sistema vascular como sales minerales, sacarosa, ciertos aminoácidos, vitaminas y factores de crecimiento (auxinas y citocininas). La composición exacta del medio de cultivo debe ser ajustada de acuerdo a los requerimientos de los diferentes tejidos, grupos de plantas y a los objetivos planteados, en algunas especies y cultivares se requieren suplementos adicionales (como complejos orgánicos; agua de coco, jugos de frutas, hidrolizado de caseína, entre otros) para mantener un crecimiento adecuado. El medio nutritivo generalmente se solidifica con agar, pero los

cultivos líquidos son mas adecuados para algunos objetivos y en ciertos estados del cultivo de otras. Un método alternativo es utilizar puentes de papel filtro que soportan al explante sobre medio líquido .

El control hormonal de la morfogénesis en Cultivo de Tejidos Vegetales se deriva principalmente del trabajo de Skoog y Miller (1957) donde indican que la formación de yemas es promovida por altos niveles de citocininas en relación con las auxinas mientras que la relación contraria favorece el desarrollo de raíces (Skoog y Miller, 1957) . Este modelo funciona para un gran número de especies pero no significa que sea de validez universal .También influyen los niveles endógenos de auxinas y citocininas que aparentemente difieren de acuerdo a la especie, órgano y estado de crecimiento que intervienen en su capacidad para regenerar raices o brotes.Los niveles hormonales requeridos para la organogénesis varían considerablemente y se determinan empíricamente para cada especie mediante un minucioso trabajo experimental.

Muchos de los tejidos y plantas cultivados in vitro son en gran medida herotróficos, pues sólo en algunos casos se ha registrado actividad fotosintética, como en Glycine max (Chua y Lam, 1990). Por lo que se les proporciona en el medio de cultivo carbohidratos y otros compuestos orgánicos (Murashige, 1974). No obstante, se deben mantener ciertas condiciones de luz que son necesarias para la morfogénesis y formación de clorofila,

y diferenciación en general, estructural y bioquímica la intensidad luminosa requerida varía de acuerdo a la especie pero generalmente se encuentra entre 1,000 y 3,000 lux asimismo intensidades menores o mayores pueden ser inhibitorias. Se ha encontrado también que el fotoperiodo óptimo es de 16 hr (Murashige, 1974) y una temperatura de 20-25°C favorece generalmente el desarrollo de los cultivos .

En especial en el caso de orquídeas se ha observado en *Cattleya* spp. en cultivo con un 2% de sacarosa que se incrementa, a comparación de cultivos sin sacarosa, la concentración de clorofila a, b y clorofila total así como el cociente de clorofila a y b al igual que la concentración de carboxilasa ribulosa-1,5-bifosfato señalándose que son eventos bioquímicos importantes en el establecimiento de la autotrofia que para su síntesis requieren de una fuente de energía adicional como la sacarosa además de que en presencia de sacarosa se incrementa la actividad de la carboxilasa ribulosa-1,5-bifosfato presentando por lo tanto actividad fotosintética que se incrementa a partir de los 40 días en *Cattleya* (Arditti y Ernst, 1984).

El mecanismo de propagación vegetativa tiene como objetivo principal la formación y multiplicación de yemas meristemáticas, ya que cada meristemo es potencialmente una planta .Los cultivos in vitro usados para propagación pueden utilizar como explantes estructuras que contengan zonas meristemáticas (embriones, yemas

apicales o yemas axilares, nucelas) o a partir de explantes de órganos (hojas, peciolo, tallos, raíces) que son adecuados para la inducción de meristemas adventicios y así generar yemas o embriones. Las estructuras adventicias pueden originarse directamente o de un callo intermedio o de cultivos de células en suspensión (Fig. 1) (George y Sherrington, 1984).

Estos métodos han demostrado ser aplicables en un gran número de especies fundamentalmente en plantas ornamentales que son producidas en gran escala en distintos países. La industria de las orquídeas ha tenido un considerable avance al aplicar las técnicas de cultivo *in vitro* siendo uno de los primeros grupo de plantas que fueron regenerados in vitro multiplicadas exitosamente (Morel, 1960).

El cultivo *in vitro* de orquídeas recibió un fuerte impulso en 1922 con el Dr. Lewis Knudson quien descubrió un medio de cultivo propicio para la germinación asimbiótica de las semillas (Arditti, 1967). Posteriormente se reportó la propagación masiva y clonal por Morel (1960) quien trabajando con *Cymbidium* fué además el primero en obtener plantas a partir de meristemas apicales (Murashige, 1974; Vajrabhaya, 1977). Posterior a estos trabajos, la propagación de orquídeas por cultivo de tejidos ha tenido éxito con: protocormos, meristemas, raíces, hojas jóvenes y maduras, entrenudos, nudos, nudos de inflorescencia, pedúnculos de

flor, tallos con yemas axilares, etc. (Sagawa y Kunisaki, 1984).

Los medios nutritivos más empleados en el cultivo in vitro de orquídeas son el Knudson B y C, y el Vacin y Went (Rao, 1977). El medio Knudson C (KC) (1946) es el que mejores resultados ha demostrado.

De la aplicación de las técnicas del cultivo de tejidos a las orquídeas se han derivado múltiples beneficios tales como:

la producción de plantas libres de patógenos, la producción masiva de plantas, la multiplicación clonal, el rescate y establecimiento de híbridos, etc. que ha tenido un gran impacto en la industria de plantas ornamentales lo cual ha incrementado las investigaciones en los métodos de propagación (Rao, 1977). De esta forma se cuenta con elementos adicionales para establecer las condiciones de cultivo de especies de importancia actual y futura para el hombre y su medio (Moore, 1988).

Un cierto número de especies de orquídeas, principalmente terrestres, difícilmente germinan asimbióticamente por lo que se han realizado investigaciones con los hongos simbiotes, siendo aislados e inoculados en los medios de cultivo de dichas semillas obteniendo porcentajes de germinación considerablemente altos además de que se sugiere que las plántulas que crecen simbióticamente son más resistentes y adaptables que aquellas que carecen del hongo simbiote. Sin embargo esta situación no es general, en ocasiones

las orquídeas terrestres responden favorablemente a la germinación asimbiótica (Chávez, 1980) logrando se su propagación masiva y reintroducción a su hábitat natural (Rubluc, et al, 1989) .

II.4 *Encyclia vitellina* Dressler .

CLASIFICACION .

REINO: Vegetal

DIVISION: Embryophyta Siphonogama

SUBDIVISION II: Angiospermae A. Br. Doell

CLASE I: Monocotyledonae DC.

ORDEN 23: Microspermae Bentham y Hooker

FAMILIA: Orchidaceae Lindl.

SUBFAMILIA: Epidendriodeae

TRIBU: Epidendreae

SUBTRIBU: Laeliinae

GENERO: *Encyclia* DresslerESPECIE: *Encyclia vitellina* Dressler

Encyclia vitellina (Lindl.) Dressler, Brittonia
13:265.1961.

Epidendrum vitellinum Lindl. Gen. & Sp. Orch. Pl. 97.1831.

Epidendrum vitellinum var *giganteum* Warner, Select. Orch.
Pl. 3: t. 27.1877-78.

Epidendrum vitellinum var *autumnale* G. Wilson, Orchid
World 4: 27.1913

DESCRIPCION. Planta epifita. Seudobulbos agrupados, cónico- ovoides, ligeramente aplanados, 2.5-5cm de largo, 15-30mm de ancho; Hojas 1-3 en cada pseudobulbo, lanceolado-elípticas, obtusas o subagudas 7-22cm de largo, 0.8-3.6cm de ancho. Inflorescencia sencilla o poco ramificada, con 4-12 Flores vistosas, resupinadas, aproximadamente de 3 cm de diámetro, 12-30cm

de largo con una espata hasta de 1.5cm de largo; color sépalos y pétalos rojo naranja, labelo y columna amarillos, antera y ápice del labelo anaranjado-rojizos. Sépalos elípticos, lanceolado- elípticos, agudos 15-22mm de largo, de 3-8mm de ancho. Pétalos elípticos o ampliamente elípticos, agudos 17-23cm de largo, 6-11mm de ancho. Labelo unido con la columna en la base, largo total 11.5-16mm, la lámina elíptica u oblongo-elíptica aguda 3.5-5mm de ancho, los lados vueltos hacia abajo. Callo oblongo, pasando a tres venas cortas en la lámina. Columna de 6-7mm de largo, el diente medio subcuadrado, algo aplanado, más corto que los laterales. Cápsula algo triangular en sección pero sin alas, aproximadamente 30mm de largo y 15 mm de ancho.

DISTRIBUCION. Guatemala y México (Chiapas, Oaxaca, Puebla y Veracruz) de 1500 a 2600 m de altitud en bosque de pino y encino y bosque mesófilo de montaña.

FLORACION. Principalmente de abril a septiembre probablemente durante todo el año

RECONOCIMIENTO. Esta es la única Encycelia de México o centroamérica con flores de color rojo-anaranjado. Sépalos y pétalos amplios en combinación con el labelo angosto, los cuales son característicos.

ESTADO DE CONSERVACION. Se considera una especie vulnerable que ha sido sobrecolectada por más de 150 años, tiene importancia hortícola considerable por su demanda en el extranjero y en el mercado internacional. Un gran número de poblaciones han desaparecido por esta causa.

II.5 Mormodes badia

CLASIFICACION .

REINO:Vegetal

DIVISION: Embryophyta Siphonogama

SUBDIVISION:Angiospermae A. Br. Doell

CLASE I:Monocotyledonae DC.

ORDEN 23:Microspermae Bentham y Hooker

FAMILIA :Orchidaceae Lindl.

SUBFAMILIA:Vandoideae

TRIBU:Cymbidieae

SUBTRIBU:Catasetinae

GENERO:Mormodes

ESPECIE:Mormodes badia Rolfe ex Watson

Mormodes badia Rolfe ex Watson, Gard.&Forest
10:54.1897 (como Mormodes ladium por error).-Mormodes
badium Rolfe, Gard.Chron.ser. 3.21:51.1897. (nomen
subnudum).

Mormodes badium var luteum
Rolfe, Gard.Chron.ser.3.21:51.1897.

DESCRIPCION. Planta epifita. Seudobulbos elipsoides a ovoides u oblongo-cónicos, cubiertos cuando jóvenes por 7-9 hojas que proceden de sendos nudos; 5-15cm de largo, 3-5cm de diámetro. Hojas deciduas, largas, angostamente elípticas, plegadas, con 3-5 nervios prominentes en el reverso, articuladas cerca de su base, dejando vainas cortas, escariosas e imbricadas que cubre parcialmente al pseudobulbo; hasta 45cm de largo, 4-5cm de ancho; las hojas se caen antes de o al abrir las flores, una vez madurado el pseudobulbo.

Inflorescencia una o dos por pseudobulbo, hasta 45 cm de largo, hasta con 25 flores cada una en la mitad apical. Flores vistosas, rojo ladrillo, amarillas, o sépalos anaranjados y labelo anaranjado rojizo; 4cm de diámetro; ocasionalmente aromáticas, especialmente por la mañana. Ovario pedunculado de unos 25cm de largo, protegido en la base por una bráctea pequeña, oblongo deltoide, aguda, 3-5 nervia; 10mm de largo, 6mm de ancho. Sépalo dorsal angostamente ovado, lanceolado, acuminado, 31mm de largo, 6-10mm de ancho. Sépalos laterales semejantes algo oblicuos, engrosados hacia la base; 20-30mm de largo, 7-14mm de ancho. Pétalos elíptico-lanceolados, acuminados, algo oblicuos, márgenes apicales erosos; 28-29mm de largo, 9-12mm de ancho, engrosados hacia la base. Labelo obreniforme al extenderse, en forma de silla en posición natural,

carnoso, rígido, unguiculado, la uña cuneada, carnosa, 6mm de largo, provisto de un mucrón prominente, recto de 5-6mm de largo, en el seno; 25-32mm de largo total, 30-32mm de ancho. Columna torcida, arqueada cuando joven, el apículo en forma de gatillo colocado transversalmente hacia atrás con el tiempo una vez lanzado el polinario; 3mm de largo, el apículo 5mm de largo. Antera formada por una lámina rómbica, márgenes involutos, una laminilla en cada lado separando los polinios; 6mm de largo, 6mm de ancho. Polinario lanzado con la antera cuando el apículo en forma de gatillo de la columna es empujado, el estípote-resorte arqueándose hacia adelante; polinios dos, elipsoides, sulcados. Cápsula elipsoide, de unos 8cm de largo, 2.5cm de diámetro.

DISTRIBUCION. Sólo se le conoce en México: Jalisco y Nayarit. De 700-1500m de altitud. En bosque tropical caducifolio, encinar cálido y bosque de pino y encino, generalmente en las horquetas de los encinos más viejos, sobre árboles muertos, o en la base de los troncos.

EPOCA DE FLORACION. De octubre a Enero.

RECONOCIMIENTO. *Mormodes badia* se reconoce fácilmente por el labelo ancho y transversalmente elíptico a obreniforme con un apículo prominente en el ápice y por los sépalos laterales que son tanto o más anchos que los pétalos, una característica poco usual dentro del género.

ESTADO DE CONSERVACION. Se considera una especie rara ya que tiene una distribución restringida, aunque puede ser localmente abundante, la distribución de sus poblaciones es sumamente dispersa (Hágsater, 1976).

II.6 Mormodes rosilloana

CLASIFICACION.

REINO: Vegetal

DIVISION: Embryophyta Siphonogama

SUBDIVISION II: Angiospermae A. Br. Doell

CLASE I: Monocotyledonae DC.

ORDEN 23: Microspermae Bentham y Hooker

FAMILIA: Orchidaceae Lindl.

SUBFAMILIA: Vandoideae

TRIBU: Cymbidieae

SUBTRIBU: Catasetinae

GENERO: Mormodes

ESPECIE: Mormodes rosilloana

Salazar: Inédita.

Mormodes rosilloana Salazar. Inédita .(En preparación).

DESCRIPCION. Planta epífita. Raíces carnosas 2-5 mm. de diámetro. Seudobulbos agrupados ovoide-fusiformes, parcialmente cubiertos por vainas papiráceas, persistentes, blancas o grisáceas, con arrugas y surcos longitudinales al envejecer, 7- 11 cm de largo, 2.5-3.5 cm de diámetro. Hojas dísticas, articuladas en la base con las vainas que envuelven al pseudobulbo, deciduas, plicadas, linear-elípticas, agudas a largamente acuminadas 12-40 cm de largo, 2-4 cm de ancho. Inflorescencia racemosa arqueada, 2-3 por pseudobulbo, originándose de la base del nuevo brote antes

de que madure el pseudobulbo, 16-30 cm de largo. Pedúnculo subredondo, hasta 5 mm de diámetro. Brácteas del escapo tubulares y obtusas a agudas las inferiores, libres, ovadas y agudas las superiores, herbáceas, 1-1.3 cm de largo. Brácteas florales ovado-lanceoladas a lanceoladas, agudas, subescariosas, 6-11 mm de largo, 3-5 mm de ancho. Ovario pedicelado, curvado, subredondo, algo ensanchado en la mitad apical, con 6 costillas evidentes, (2.5) 3.1-4 cm de largo, hasta 4 mm de diámetro. Flores vistosas, semiesféricas de color amarillo naranja con puntos púrpura en el interior de sépalos y pétalos e hileras de manchitas púrpura oscuro en el lóbulo apical del labelo; fragancia especiada. Sépalo dorsal elíptico-lanceolado, algo cóncavo, con los márgenes ligeramente revolutos, ápice agudo, 2.5-3 cm de largo, 1-1.4 cm de ancho. Sépalos laterales elípticos, oblicuos, algo cóncavos con márgenes ligeramente revolutos, ápice conduplicado, agudo, mucronado, 3-3.2 cm de largo, 1.2-1.6 cm de ancho. Pétalos elípticos a ovado-elípticos, algo cóncavos, con márgenes menudamente ondulado-erosos, ápice conduplicado, algo recurvado, agudo, 2.7-3.2 cm de largo, 1.7-1.9 cm de ancho. Labelo cuneado-espátulado en forma general, oscuramente trilobado, 27-29 mm de largo total, 8-9 mm de ancho a la altura de los lóbulos laterales; lóbulos laterales muy pequeños, redondeados; lóbulo medio curdiforme, cóncavo, márgenes ligeramente revolutos, ápice abruptamente apiculado 1.2-1.5 cm de largo aproximadamente 1.5 cm de ancho. Columna

Subclaviforme, arqueada, torcida, con un rostro apical sensitivo 1.1-1.5 cm de largo. Polinario compuesto; polinios 2, ovoides, amarillos, sulcados; estípites laminar. Cápsula elipsoide de aproximadamente 6 cm de largo, 4 cm de diámetro con un pedicelo corto.

DISTRIBUCION. Conocida únicamente en Guerrero (Atoyac de Alvarez) y Estado de México (Sultepec) .De 1000 a 2000 m de altitud.

FLORACION. Agosto y Septiembre .

ESTADO DE CONSERVACION. En peligro de extinción. Sólo se han hallado dos plantas en zonas de producción cafetalera. La especie no está sujeta a presiones de colecta pero es bastante escasa y su habitat natural está siendo rápidamente modificado por la expansión de los cafetales .

IV. MATERIALES Y METODOS

IV.1 Material biológico

Se utilizaron semillas de *Mormodes badia* Rolfe ex Watson (Jalcocotán, Nayarit, abril, 1985) y *Mormodes rosilloana* Rosillo (El Paraíso Guerrero, marzo, 1985) proporcionadas por la Asociación Mexicana de Orquideología (AMO) las semillas se almacenaron en un sobre de papel a temperatura ambiente (18-20°C) durante 4 y 5 meses respectivamente, después de lo cual se conservaron a 8°C en un recipiente sellado herméticamente utilizando CaCl₂ anhidro, como desecante. Almacenadas de esta forma se tomaron semillas para sembrarse en los medios indicados en la Tabla 1.

Las semillas de *Encyclia vitellina* Dressler se obtuvieron de la colección de orquídeas del Jardín Botánico del IBUNAM, los frutos maduros (no dehiscentes) fueron cosechados aproximadamente a los dos meses de la polinización y secados durante una semana a temperatura ambiente (18-20°C), después de lo cual las semillas fueron sembradas asépticamente en los medios de cultivo.

IV.2 Explantes

Las semillas se consideraron como el explante inicial y a partir de la germinación de estas se obtuvieron otros explantes.

Por lo cual, los explantes utilizados fueron los siguientes:

- a. semillas
- b. protocormos
- c. masas de protocormos
- d. secciones de masas de protocormos
- e. nudos

Los explantes se sembraron en diferentes medios y en los medios con diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento. De cada siembra se hicieron de 2 a 40 lotes y el número de explantes por lote varió (de 1 a 373) de acuerdo al experimento.

A partir de la germinación de las semillas se produjeron estructuras esféricas denominadas protocormos(b) con un diámetro de 1-18mm de acuerdo con la especie (Fig. 1) algunos de los protocormos, o todos dependiendo de la especie, formaron masas de protocormos(c) que se utilizaron directamente como explantes, de *Mormodes badia* se consideraron como explantes secciones de masas de protocormos(d) con un diámetro de 1-5mm(secciones), de *E. vitellina* y *M. rosilloana* no se consideró este tipo de explante debido a que con la disección se provocó una severa oxidación y muerte del explante.

El desarrollo de plántulas permitió en *M. badia* explorar el cultivo de nudos.

IV.3 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron el medio Vacin y

Went (VW) y el Knudson C (KC) (Knudson, 1946), este último modificado con sacarosa 25 y 30 g/l, adicionándole las vitaminas del medio B5 (Gamborg et al, 1968) micronutrientes del Murashige y Skoog (1962) (MS) al 10% de su concentración original, L-Glutamina 15mg/l, e hidrolizado de caseína 100 mg/l además de Bencilaminopurina (BAP) 5 μ M, Acido alfa-naftalenacético (ANA) 0.1 μ M, de estos dos reguladores de crecimiento se prepararon inicialmente soluciones concentradas 10-3 molar (M). La composición de los medios de cultivo se señalan en el Apéndice.

Las soluciones concentradas se conservaron a 6°C en botellas de color ámbar de las que se tomaron las alícuotas necesarias para llevarlas a los volúmenes y concentraciones deseadas al aforar con una probeta después de agregar todos los componentes de los medios. El pH en todos los casos se ajustó a 5.0 utilizando soluciones de HCl y NaOH al 0.1 y 0.5N. Posteriormente se les adicionó el agar y este se disolvió agitando y calentando en una parrilla de agitación y calentamiento. Finalmente a frascos de 125 ml y boca ancha se agregaron 20ml de medio por frasco, se colocaron tapas de plástico y se esterilizaron en un autoclave a una

presión de 1.5 Kg/cm² (20lb/pulg²) a 120°C durante 15 minutos.

Los medios de cultivo se modificaron de acuerdo al tipo de explante, indicándose las modificaciones efectuadas en las Tablas 1 y 2 .

IV.4 Siembra

El cultivo de tejidos requiere de un ambiente en condiciones asépticas, por lo cual se manipularon todos los explantes en una campana de flujo laminar, previamente desinfectada con alcohol etílico industrial a 96% al igual que el resto del material, como frascos de cultivo e instrumental. Para la germinación asimbiótica se procedió a desinfectar las semillas en hipoclorito de calcio Ca(OCl)₂ al 7% (Chávez, 1980) durante 30 minutos agitando a intervalos con una aguja de disección para romper la tensión superficial. Posteriormente, con una jeringa se extrajo la solución desinfectante y se enjuagaron 3 veces las semillas con agua destilada esterilizada.

Una vez que las semillas se desinfectaron, se procedió a la siembra (en promedio 337 semillas para *E. vitellina* y 262 para *M. badia* y *M. rosilloana*) repitiendo la siguiente operación para cada frasco de cultivo : cerca de la flama del mechero se destapó el frasco con medio de cultivo y con una espátula

desinfectada con alcohol y flameada se tomaron y depositaron las semillas en el medio. Con una jeringa se agregaron 0.5ml de agua destilada esterilizada para dispersar y mantener húmedas las semillas.

Los otros tipos de explantes al provenir de semillas germinadas asimbióticamente no requirieron desinfección y su manipulación y siembra se realizó asépticamente en la campana de flujo laminar. El criterio de germinación seguido en el presente trabajo fué para *M. badia* y *M. rosilloana* la presencia del color verde de la clorofila en el embrión considerando que germinaron en presencia de luz y para *E. vitellina* el crecimiento del embrión y la ruptura de la testa debido a que germinó en obscuridad.

IV.5 Condiciones de incubación

Posteriormente las semillas se incubaron en fotoperiodo de 16h luz, $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y 1000 Lux de intensidad lumínica; obscuridad a una temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$; luz continua $28 \pm 2^\circ\text{C}$, 3000 Lux; luz continua $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 1000 Lux y luz continua roja $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 1000 lux (Tabla 1).

Por su parte los protocormos de *Encyclia vitellina* se incubaron a 800 lux una semana con una temperatura de $20 \pm 3^\circ\text{C}$, posteriormente expuestos a 50 Lux y $20 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 4 y 8 semanas. Los explantes que se utilizaron adicionalmente fueron incubados en fotoperiodo de 16 h

luz, $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y una intensidad lumínica de 1000 Lux

(Tabla 2).

RESULTADOS Y DISCUSION

En diversos Jardines Botánicos se desarrollan actualmente programas de micropropagación de especies de orquídeas amenazadas, (Rao, 1977; Fay, 1990, com pers.) lo cual generalmente se realiza a partir de semillas para garantizar la estabilidad genética y la variabilidad intrínseca en cada organismo.

Especialmente en el caso de orquídeas amenazadas se percibe que los métodos exitosos para algunas especies no siempre son aplicables a otras, registrándose en algunos casos un porcentaje de germinación *in vitro* menor al 1% (Arditti, 1981), por lo cual es necesario aplicar otras técnicas de micropropagación adicionales a fin de obtener el mayor número de plantas que sea posible. Por esta razón en el presente trabajo se emplearon otras técnicas de cultivo de tejidos como son la inducción de embriogénesis somática en protocormos y el cultivo de yemas axilares .

Germinación .

Considerando que los procedimientos usados para la propagación *in vitro* parten del establecimiento de las condiciones de cultivo se utilizaron diferentes medios y sus modificaciones para obtener una respuesta en la germinación de semillas de orquídeas, los resultados obtenidos para las tres especies investigadas se muestran

en la Tabla 3 especificando medios de cultivo, condiciones de incubación, porcentajes de germinación así como el tiempo de aparición de protocormos, brotes y raíces.

Encyclia vitellina

En el medio original KC que se utilizó inicialmente, se presentó una respuesta, menor al 1%, a diferencia de VW en el que no hubo respuesta, por tal razón se eligió el primero y se realizaron las modificaciones en dicho medio para intentar mejorar su efecto (Tabla 3).

La germinación de semillas de orquídeas y el desarrollo de plántulas varía en sus requerimientos y respuesta a la luz y/o fotoperíodos (Arditti y Ernst, 1984; Arditti, 1982). Existen datos insuficientes para hacer generalizaciones. Sin embargo, podemos decir que las epifitas germinan en luz y en obscuridad aunque parece que requieren luz para la inducción y formación de brotes y/o raíces (Arditti y Ernst, 1984). Algunas especies terrestres responden de manera similar (Ueda y Torikata 1972; Werckmeister, 1970; 1971 citados por Arditti y Ernst, 1984).

Los efectos inhibitorios de la luz, los cuales prevalecen en la mayoría de las especies terrestres, han sido descritos como "parte de...un mecanismo de protección...que hace imposible para las semillas desarrollarse en la superficie del suelo donde podrían

estar sujetas a desecación durante el periodo de crecimiento" (Stoutamire, 1974 citado por Arditti y Ernst, 1984). Esto no es claro en las semillas de las especies epifitas, las cuales están sujetas a los mismos peligros y no se ha observado el mismo mecanismo o tienen menor necesidad de él (Arditti y Ernst, 1984). En nuestros experimentos con esta especie los cultivos se sometieron a 4 diferentes condiciones de luz y temperatura, la mejor respuesta se presentó en KC+ vit B5 y 2.5% sac, registrándose un porcentaje de germinación del 33.9% emergiendo masas de células en un periodo de 8 semanas incubadas en oscuridad a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, la adición de compuestos nitrogenados o una mayor concentración de sacarosa resultaron inhibitorios (Tabla 3). Se ha mencionado frecuentemente que la niacina mejora la germinación de semillas con mayor consistencia que otras vitaminas (Arditti, 1967; 1977; Arditti y Ernst, 1974; Arditti y Harrison, 1977; Arditti y Tarr, 1979; Withner, 1959; 1974 citados por Arditti y Ernst, 1984). Estos hallazgos indican que las orquídeas pueden tener un requerimiento de niacina que el hongo micorrízico satisface en la naturaleza. Esta suposición está apoyada por la evidencia de que la niacina es liberada en el medio de cultivo por hifas de *Rhizoctonia* aisladas de *Dactylorhiza purpella* (Harvis y Pekkala, 1975 citados por Arditti y Ernst, 1984). Hojas y plántulas de orquídeas sintetizan niacina por la vía de degradación del triptofano (Arditti y Tarr, 1979; Cooper et al, 1982;

Tarr y Arditti, 1981 citados por Arditti y Ernst, 1984). La tiamina representa un caso interesante de coevolución en un nivel bioquímico-fisiológico. Algunos investigadores han reportado que esta vitamina mejora la germinación y el crecimiento (Arditti, 1967, 1979; Arditti y Harrison, 1977; Withner, 1959, 1974 citados por Arditti y Ernst, 1984). Y es considerada entre las vitaminas, como la única esencial (Murashige, 1974). Se ha demostrado que la vitamina misma, o su fracción de pirimidina sola, fué capaz de mejorar la germinación y desarrollo (Magrou y Mariat, 1945; Mariat, 1944; 1948; 1952 citados por Arditti y Ernst, 1984). Bajo condiciones simbióticas hongos como *Corticium catonii* (Capelletti, 1947 citado por Arditti y Ernst, 1984) y *Rhizoctonia* aislados de *Cymbidium* (Hijner y Mariat, 1973 citados por Arditti y Ernst, 1984) proveen a las semillas germinadas y plántulas en desarrollo, de tiamina y sus componentes. En otros casos el hongo micorrízico puede obtener tiamina o tiazol, cuando lo requiere, de la orquídea (Arditti y Ernst, 1984). Por su parte la piridoxina se ha reportado que mejora la germinación o crecimiento, no tiene efectos, o es inhibitoria (Arditti y Harrison, 1977 citados por Arditti y Ernst, 1984).

Por otro lado, se utilizaron modificaciones de el KC (Tabla 3) en las que se presentaron porcentajes de germinación menores al 1%, una de estas modificaciones consiste en el aumento de la concentración de sacarosa presente de 2.0% a 2.5% y 3%(Tabla 3), El azúcar más

comúnmente usado en cultivo de semillas y plántulas es la sacarosa. Puede mantener el crecimiento de igual forma si es autoclaveado o esterilizado por filtración, pero sus efectos pueden variar de acuerdo a la concentración (Homes y Vanseveren Van Espen, 1973 citados por Arditti y Ernst, 1984). La proliferación de protocormos en *Cymbidium* mejoró a niveles supraóptimos mientras que la organogénesis fué mejorada a concentraciones subóptimas (Arditti y Ernst, 1984). Asimismo se ha observado, en *Cattleya aurantica*, que una vez que la primera hoja ha aparecido los carbohidratos adicionados exógenamente no se requieren para el crecimiento y desarrollo (Harrison y Arditti, 1973 citados por Arditti y Ernst, 1984).

Un reducido aumento mostró resultados benéficos, KC+vit B5+2.5% de sacarosa, pero al aumentar al 3% disminuyó drásticamente la respuesta. La sacarosa en general se usa en un porcentaje de 2% al 2.9% , posiblemente una concentración mayor presentó efectos tóxicos debido al stress osmótico al que se sometieron las células (Chávez, 1980).

El hidrolizado de caseína , lactalbumina, peptona o triptofano frecuentemente son utilizados en los medios de cultivo con resultados variables (Arditti, 1979; Harvais, 1972, citado por Arditti, 1982) en el presente trabajo se utilizaron 100 mg/l de hidrolizado de caseína considerando que es una mezcla compleja de composición

variable en el que se presentan aminoácidos, sales minerales y vitaminas.

La adición del hidrolizado de caseína, las vitaminas del B5 y 3% de sacarosa resultaron inhibitorios (Tabla 3), debido posiblemente a que esta sustancia es una mezcla compleja la cual puede cambiar químicamente durante el autoclaveado (Arditti y Ernst, 1984), o bien cuenta entre sus aminoácidos con algunos que resultaron tóxicos para esta especie y estructura (George y Sherrington, 1984), es difícil, especular en las razones de sus efectos (Arditti y Ernst, 1984) además, debe considerarse el efecto osmótico de la sacarosa.

Para la germinación de semillas se requieren fuentes de nitrógeno amoniacal, el amonio puede ser asimilado por dos vías diferentes: la primera denominada vía glutamino sintetasa/ glutamato sintasa. Convierte el amonio primero en glutamina y después en ácido glutámico, mientras que la segunda denominada de la deshidrogenasa glutámica, produce ácido glutámico directamente. Una vez que el amonio se ha incorporado a una molécula orgánica, como grupo amino del ácido glutámico, es traslocado a otras moléculas orgánicas para formar los demás aminoácidos mediante transaminasas (Esquema 2) (Loyola et al, 1981). Casi todos los aminoácidos y sustancias relacionadas han sido probados en medios para germinación, como suplementos o fuentes de nitrógeno. Se ha registrado que la arginina, ornitina y urea puede reemplazar al NH_4NO_3 en cultivos de *Cattleya*, asimismo, fenilalanina,

citrulina, tirosina, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, asparagina y fenilurea no pueden reemplazarlos. Prolina y ácido alfa-aminobutírico sirven moderadamente, como fuentes de nitrógeno (Raghavan, 1964;1976; Raghavan y Torrey 1964 citados por Arditti y Ernst, 1984). En experimentos realizados con *Orchis sp* el hidrolizado de caseína puede ser reemplazado por la reconstitución de sus aminoácidos o por glutamina únicamente, que tuvieron un efecto similar en *Cattleya* (Raghavan y Torrey, 1964; Mead y Bulard, 1975 citados por Arditti y Ernst, 1984). La modificación efectuada en este caso consistió en la adición de 15mg/l de L-Glutamina, sin tener un efecto en la germinación de semillas de *Encyclia vitellina*.

Una de las condiciones de incubación consiste en utilizar luz roja para inducir la germinación, si su germinación es afectada por la luz se denominan semillas fotoblásticas y este fotoblastismo puede ser positivo o negativo según provoque o inhiba la germinación. La sensibilidad fótica está determinada por la actividad del fitocromo, una cromoproteína que puede cambiar de configuración por el efecto de la radiación. La radiación roja (600 - 700 nm), y en menor proporción todo el espectro de luz visible, transforman a la proteína de su forma inactiva fisiológicamente (Pr) a su forma activa (Prl). En las semillas fotoblásticas la germinación es estimulada, por la luz roja cercana e inhibida por la roja lejana con un máximo de 730 nm. No todas las

semillas fotoblásticas positivas son germinadores en luz obligados, ya que por lo general se encuentran poblaciones heterogéneas de semillas de la misma especie con diferentes requerimientos lumínicos, desde las que germinan en la obscuridad hasta las que requieren largos periodos de iluminación. Frecuentemente la diferencia de los requerimientos se debe a efectos de posmaduración, las semillas jóvenes requieren más luz que las maduras. Este efecto se debe también al fitocromo, pues parece que durante el proceso de maduración se incrementa la concentración de su forma activa (Medina, 1977). En el caso de *Encyclia vitellina* se observa un fotoblastismo negativo ya que los porcentajes de germinación más altos se presentaron en obscuridad indicando que la presencia de luz reduce notablemente el porcentaje de germinación por lo que la concentración del fitocromo en su forma activa posiblemente se encuentra en proporciones no limitantes (Tabla 3).

La formación de plantas completas ocurrió después de relizar el subcultivo en medios frescos produciendo en cada caso un brote y raíces, esta respuesta se presentó en un lapso más corto en los medios con porcentajes de germinación menores del 1%, a diferencia del medio en el que se obtuvo el mayor porcentaje de germinación y donde la formación de plantas completas ocurrió en un lapso mayor (Tabla 3), considerando que los protocormos obtenidos se utilizaron como explantes para otro experimento las semillas se incubaron en KC+ vitaminas

del B5 +2.5% de sacarosa que presentó un porcentaje de germinación del 33.9 sin considerar en este caso el tiempo de desarrollo de plantas completas.

Mormodes badia

Se realizaron las mismas modificaciones de los medios que en la especie anterior, a excepción del KC+vitaminas de B5+3% de sacarosa, presentándose en el caso de *Mormodes badia* una respuesta sumamente baja, porcentajes menores al 1 %, probablemente la respuesta se debió a la falta de viabilidad de estas semillas que bien puede asociarse a la escasez de esta especie en la naturaleza, esta condición también pudo deberse al almacenamiento de las semillas, previamente, durante 3 meses a temperatura ambiente donde los cambios de temperatura y humedad modificaron su respuesta (Arditti, 1967), o bien las condiciones de cultivo a las que se sometieron las semillas no lograron inhibir la latencia de las mismas. Se obtuvieron 6 protocormos muy voluminosos (5-12 mm), solamente uno de ellos continuó su desarrollo normal formando 1 planta completa, la respuesta de germinación se presentó en un periodo muy prolongado (12-56 semanas) a diferencia de lo observado en *E. vitellina* que en 5-8 semanas se logró la germinación lo que podría confirmar los argumentos anteriores. Para *M. badia* si ocurrió germinación en VW y

sin embargo, los mejores medios en coincidencia con E. vitellina fueron KC y KC+ vit B5 + 2.5% sac.

Las semillas de M. badia requirieron de iluminación (fotop. 16 h) y $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

Mormodes rosilloana

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

En esta especie se presentó un porcentaje de germinación del 40% a las 7 semanas en fotoperiodo de 16 h, $28 \pm 2^\circ\text{C}$ en KC+ vitaminas de B5+15mg/l de L-Glutamina, obteniéndose masas de protocormos directamente, con un 100% de brotación múltiple presentando un promedio de 4 brotes por explante, en este caso es probable que el medio enriquecido y la combinación de sus componentes promoviera el desarrollo, o que la respuesta ocurriera al tratarse de semillas poliembriónicas, (Veyret, 1974). No se registran reportes de poliembrionía en esta especie ni en especies relacionadas por lo que se considera más factible el primer argumento. Esta respuesta era esperada en cierta medida pues el medio de cultivo en que ocurrió tiene la misma formulación que el utilizado para la producción de PLBs en M. badia.

En dicho medio se presentó asimismo (en un 100%) la formación de raíces (de 1 a 3 raíces) y pseudobulbos de tamaño reducido. Se intentó establecer algunas plántulas en invernadero sin éxito alguno, por lo que se mantienen in vitro actualmente. Las dos plantas adultas que se colectaron no se logró mantenerlas en condiciones de

invernadero. Con este antecedente se considera adecuado aumentar la talla de las plántulas in vitro para reducir riesgos durante la aclimatación. Se intentará su establecimiento paulatinamente en lotes reducidos a fin de lograr el establecimiento del mayor número de plantas.

Embriogénesis somática en protocormos de *Encyclia vitellina*

Ciertos explantes son capaces de producir embriogénesis directa in vitro, esto parece estar limitado a tejidos predeterminados hacia esta vía como los embriones cigóticos y somáticos y en cotiledones e hipocótilos. Aparentemente los genes que regulan la embriogénesis, a veces permanecen activados en los tejidos de las plántulas formadas, que retienen por lo tanto una competencia embriogénica produciendo embriones adventicios los que se producen realmente de las células superficiales. La proliferación de embriones adventicios se ha registrado normalmente en embriones cigóticos que han sido transferidos a cultivos asépticos como en cebada (Norstog, 1970 citado por George y Sherrington, 1984) cacao (Pence et al, 1980 citado por George y Sherrington, 1984).

En el cultivo in vitro de orquídeas se presentan cuerpos con morfología y desarrollo posterior idénticos a los protocormos denominándose comunmente PLBs (Protocorm

like bodies) estas estructuras se forman directamente del explante o indirectamente a partir de callo o en cultivos en suspensión .

Diversos autores consideran que la aparición de protocormos en cultivos de orquídeas es una manifestación de la embriogénesis (Champagnat y Morel, 1972, citados por George y Sherrington, 1984). Asimismo, se señala que durante la embriogénesis somática in vitro, es frecuente que al inicio del cultivo se observen grupos de células indiferenciadas, comparables a los protocormos, de los cuales se originan yemas proembrionicas . En esta especie los protocormos obtenidos a partir de la germinación se sometieron durante una semana a 800 Lux para que adquirieran la coloración verde característica de la presencia de clorofila, posteriormente se subcultivaron en el mismo medio (KC+vitaminas del B5 +2.5% de sacarosa) incubándose a 50 Lux de intensidad y $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ sin hormonas de crecimiento obteniéndose un 80% de brotación múltiple a las 4 semanas y un 70% a las 8 semanas (Tabla 4), aquellos protocormos que no fueron sometidos a este tratamiento, sólo en forma eventual produjeron PLBs. Considerando reportes previos en otras especies que no necesitan citocininas para estimular la proliferación se omitieron las hormonas, en plantas de papa pueden proliferar yemas axilares a partir de nudos en un medio sin reguladores de crecimiento (Hussey y Stacey, 1981 citado por Hussey, 1986) plántulas de *Picea sitchensis* proliferan asimismo en un medio sin hormonas (John, 1983

citado por Hussey, 1986) y *Pseudotsuga menziesii* responde de forma semejante en un medio con bajos niveles de nitrato de amonio (Boulay, 1979 citado por Hussey, 1986) con respecto a los bajos niveles de iluminación utilizados se ha registrado que en especies de *Phalaenopsis* se incubaron secciones de escape floral para reducir la oxidación reduciendo también la formación de PLBs a diferencia del tratamiento utilizado para *Encyclia vitellina* en el que se obtuvo brotación múltiple sin hormonas y una intensidad lumínica muy baja (50 Lux), se generó también un porcentaje de plantas de tallo único de 20% para 4 semanas y 40% para 8 semanas (Tabla 4), al aplicar la prueba de t para detectar la presencia de diferencias significativas no se obtuvo un resultado positivo, (con un nivel de confianza de 95%) pero considerando un nivel de confianza del 60% si se presentan diferencias significativas, sin embargo el número de brotes se triplicó (343.4 y 311% respectivamente)(Tablas 4 y 4a) y se observó un promedio de brotes por explante con brotación múltiple de 3.9 brotes para 4 semanas y 4.9 brotes para 8 semanas, esta respuesta no está controlada aún, como lo demuestran las desviaciones estandar (Tabla 4a), pero se manifiesta una tendencia favorable sobre todo si se considera que se trata de una especie amenazada y es una forma viable para obtener un mayor número de plantas y posteriormente tratar de reintroducirlas a su habitat. La mejor respuesta de protocormos de *Encyclia vitellina* por lo

tanto se considera que corresponde a 4 semanas considerando el tiempo además del porcentaje de brotación múltiple (80%) aún cuando se reduce un poco el número de brotes por explante.

Las plántulas obtenidas no presentaban raíz por lo que se subcultivaron a un medio enriquecido con 10% de micronutrientes del medio Murashige y Skoog además de 15mg/l de L-Glutamina, las vitaminas de B5 y 2.5% de sacarosa presentando formación de raíces en un 100% (de 2 a 5 raíces) y un tamaño mayor además de que el 12% formó pseudobulbos. Sin embargo, al pasarlas a tierra todas perecieron. Esto se debió a los problemas de aclimatación de las plántulas cultivadas in vitro. Uno de estos problemas se crea porque la humedad relativa en los recipientes de cultivo es cercana al 100% por lo que se reduce la presencia de la capa cerosa presente en la cutícula, y se recomienda disminuir paulatinamente el porcentaje de humedad relativa aún cuando se reduce la rizogénesis (Hussey, 1986). En el presente trabajo las plantas no resistieron el periodo de aclimatación.

Embriogénesis somática en secciones de protocormos

de *Mormodes badia*

La proliferación de embriones somáticos a partir de secciones de protocormos se basa en el fenómeno de regeneración de nuevos protocormos (embriones

somáticos)(propagación clonal) es, entre otras, una de las vías que se utilizan con frecuencia en orquídeas, esta técnica se inicia con los trabajos realizados por Morel(1963) en *Cymbidium* y *Cattleya*. Cuando el protocormo es seccionado en varias partes y transferido a un medio nuevo no se diferencia en una yema sino que regenera una masa de nuevos protocormos, esta regeneración se produce básicamente en la epidermis y subcultivando y seccionando frecuentemente es posible mantener esta proliferación por un periodo indefinido (Morel, 1974).

Para esta especie la inducción de PLBs se logró en mayor medida en medio KC+vit B5+BA 5 μ M+ ANA 0.1 μ M+ Glu en fotop. 16 h, 28 \pm

2°C, la presencia de Glutamina fué un factor estimulante de la respuesta, favoreciendo la formación de plántulas.

Propagación de plantas a partir de yemas axilares.

La producción y desarrollo de yemas axilares ha demostrado ser en general el más seguro y aplicable método de propagación clonal in vitro, se utilizan 2 métodos:

a) Cultivo de yemas apicales

b) Cultivo de nudos

ambos dependen de la estimulación del crecimiento de yemas axilares por la inhibición de la dominancia apical.

El cultivo de nudos es una técnica que puede ser usada para propagar plantas a partir de yemas axilares. El cultivo se inicia a partir de yemas apicales que crecen en yemas ramificadas de 5 a 10 cm de longitud, originándose algunos nudos discretos y separados. Posteriormente se inhibe la dominancia apical y promueve el desarrollo de yemas laterales por alguno de los siguientes métodos:

-Las yemas pueden ser colocadas en medio fresco en una posición horizontal. Este método ha sido usado por Wang (Wang, 1977 citado por George y Sherrington, 1984) para propagar papa.

-Cada yema puede ser cortada en nudos que son subcultivados, las hojas generalmente se recortan de manera que cada explante consiste de una parte de tallo que origina una o varias yemas laterales.

La brotación de yemas axilares obtenida por alguno de estos métodos puede proliferar nuevamente en yemas ramificadas para iniciar nuevos subcultivos o pueden enraizarse los brotes para transferirse al suelo (George y Sherrington, 1984)

El cultivo de nudos es por lo tanto el método más simple de propagación in vitro que requiere solamente del crecimiento del brote y aplicable principalmente en las especies que producen tallos alargados en cultivo especialmente si la estimulación de las yemas laterales es difícil de lograrse con las citocininas disponibles. Para M. badia este fué el caso y el método empleado para

propagarla con buen éxito (Tablas 6 y 6a). En algunas especies cultivadas como papa es el método más practicado (George y Sherrington, 1984).

El desarrollo de plántulas provenientes de las secciones de PLBs permitió explorar el cultivo de nudos, de cada uno se logró en promedio de 2.6-3.36 yemas.

El enraizamiento ocurrió en el mismo medio de cultivo.

Se cuenta con cerca de 80 plántulas in vitro de las cuales un lote se experimentará su aclimatación en suelo y otro continuará seccionándose para incrementar el número de plántulas.

Fue observado que a medida que transcurrían los periodos de incubación (8, 12, 20 semanas) aumentó el número de nudos que respondían y el número de yemas en desarrollo, preexistentes y posiblemente de nueva formación. Esto puede explicarse en relación a que fue requerido tiempo y la acción de los reguladores exógenos para eliminar la dominancia apical.

CONCLUSIONES

La germinación de las semillas se logró modificando experimentalmente diferentes factores durante el cultivo in vitro, poniendo de manifiesto que componentes del medio nutritivo como la sacarosa pueden tener un papel nutricional (estructural) y también un efecto osmótico que a determinadas concentraciones de este carbohidrato se favoreció la germinación de las semillas, como fue claro en E. vitellina al probar en las formulaciones de KC 2, 2.5 y 3% de sacarosa.

En esta misma especie también fue decisivo el factor luz que puede tener acción sobre la expresión de genes (Chua y Lam, 1990).

Los requerimientos para las respuestas in vitro de Mormodes spp. estudiadas en el presente trabajo fueron muy similares.

La micropropagación o propagación in vitro de plantas a partir de estructuras de éstas, tiene diversas aplicaciones potenciales, en el mejoramiento de cultivos y la multiplicación de plantas y propágulos.

Los protocolos para la regeneración organogénica a partir de tejidos meristemáticos han sido ampliamente aplicables mientras que los protocolos para la regeneración embriogénica a partir de tejidos somáticos o gaméticos está surgiendo para un número cada vez mayor de especies de interés económico actual y potencial. Para especies como las orquídeas, muchas de ellas consideradas

ornamentales resulta importante el valor para el comercio que puede tener este tipo de trabajos como el aquí presentado y no sólo ello por establecerse un sistema de propagación sino también por toda la información sobre las respuestas fisiológicas de las estructuras cultivadas que llevan a un mayor conocimiento de estas plantas y de las células vegetales en general.

BIBLIOGRAFIA

- Arditti, J. 1967. Factors Affecting the Germination of Orchid Seeds. *Bot. Rev.* 33:1-97.
- Arditti, J. 1977. Clonal Propagation of Orchids by Means of Tissue Culture, A Manual. 203-239. En: J. Arditti (Ed.). *Orchid Biology Reviews and Perspectives*, 1. Cornell Univ. Press Ithaca, New York.
- Arditti, J. and R. Ernst. 1984. Physiology of germinating Orchid Seeds. 177-222 En: J. Arditti (Ed.). *Orchid Biology Reviews and Perspectives III*. Cornell. University Press. Ithaca, New York
- Ammirato, P.V. 1983. Embryogenesis. En: D.A. Evans et al (Eds.). *HandBook of Plant Cell Culture Vol.1*. Macmillan Publishing Co., New York.
- Ammirato, P.V., 1989. Recent progress in somatic embryogenesis. *Newsletter IAPTC No. 57: 2-16.*
- Beversdorf, W.D., 1990. Micropropagation in Crop Science. En: H.J.J. Nijkamp et al., (Eds.) 1990. *Progress in plant cellular and molecular biology*. Kluwer Academy Publishers, Boston.
- Collins, M., 1987. International protection of cycads. *Fairchild Tropical Garden Bulletin* 42: 28-29.
- Correll, S.T. 1950. *Native Orchids of North America, North of México*. Waltham Press. USA:1-9.

- Chávez, A.V.M. 1980. Cultivo Asimbiótico de *Bletia urbana*
. Dressler(Orchidaceae) especie endémica del
. Pedregal de San Angel.Tesis Profesional. Facultad
. de Ciencias,UNAM, México
- Chua, N. H. and E.Lam, 1990. Light responsive gene . . .
. expression in a soybean photoautotrophic cell . .
. line. En: Abstracts VII Intl. Cong. Plant Tissue .
. and Cell Culture, IAPTC, Amsterdam.
- Dodds, J.H. and L.W. Roberts. 1982. Experiments in Plant
. Tissue Culture. Cambridge Univ. Press. Cambridge.
- Evans, J.A., Sharp,W.R. and C.P. Flick. 1981. Growth . .
. Behavior of Cell Cultures: Embryogenesis and . .
. . . Organogenesis.45-113 En: T.A. Thorpe (Ed.) Plant .
. Tissue Culture Metods and Applications in
. . . Agriculture. Academic Press, New York.
- Gamborg, O.L. et al., 1968, Plant Cell Cultures I. . . .
. Nutrient Requirements of Suspension cultures of .
. soybean root cells. Exp. Cell Res. 50: 151-158.
- Gautheret, R.J. 1982. Plant Tissue Culture: The History.
. 7-12. En: A. Fujiwara (Ed.) Plant Tissue Culture .
. 1982. Proc. 5th Intl. Congres. Plant Tissue and .
. Cell Cuture. Japanese Assoc. of Plant Tissue . . .
. Culture, Tokyo.
- George, E. F. and P.D. Sherrington. 1984. Plant
. Propagation by Tissue Culture Handbook and
. Directory of Commercial Laboratories Exegetics . .
. . . Limited, Great Britain.

- Hágsater, E. 1976. Mormodes badia Rolfe ex Watson. . . .
. . . . Orquidea (Mex) 6(4): 122-124.
- Hágsater, E. 1987. Orchid Conservation and World Trade
. . . . Developments in the Neotropics. 110-113. En: . . .
. . . . Proceedings of the World Orchid Conference. Japan.
- Knudson, L., 1922. Non-symbiotic germination of orchid .
. . . . seeds. Bot. Gaz. 73: 1-25.
- Knudson, L, 1946. A new nutrient solution for the . . .
. . . . germination of orchid seed. American Orchid . . .
. . . . Society Bulletin 15: 214-217.
- Kopowitz and Stone, H. K. 1984. Plant Extinction a global
. . . . crisis. Stone Wall. Press Inc. (USA).
- Linden, E. 1989. The death of birth. Time 133:16-19.
- Loyola, V.V., Murillo, G.E. y Sanchez, J.E. 1981. El . . .
. . . . Metabolismo del Nitrógeno en las Plantas. Naturaleza
. . . . 2/81:112-116.
- Lucas, G. and Synge, H. 1978. The IUCN Plant Red Data Book
. . . . Morges. Switzerland.
- Lucas, G. and Synge, H. 1980. The Assessment and
. . . . Conservation of the Threatned Plants around The .
. . . . World. En: H. Synge (Ed.) The Biological Aspects .
. . . . of Rare plants Conservation. John Wiley and Sons.
. . . . Great Britain.
- Medina, E. 1977. Introducción a la Ecofisiología Vegetal.
. . . . OEA USA: p13 pt 102.
- Meins, F. 1986. Determinations and Morphogenetic
. . . . Competence in Plant Tissue Culture: 7-26. En: F. .
. . . . Meins. Plant Cell Culture Technology

- Moore, J. 1988. Horticultural science in a changing . . .
. world. HortScience 23:799-803.
- Morel, G.M., 1960, Producing virus-free Cymbidiums. . . .
. American Orchid Society Bulletin 29: 495-497.
- Morel, G.M.1974. Clonal Multiplication of Orchids, 169-
. 222. En:C.L. Withner (Ed.) The Orchids Scientific
. Studies. John Wiley and Sons, New York.
- Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for .
. rapid growth and bioassays with tobacco tissue . .
. cultures. Physiol. Plan. 15: 473-497.
- Murashige, T.1974. Plant Propagation through tissue . . .
. cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 25: 135-165.
- Murashige, T. 1978. The Impact of Plant Tissue Culture on
. Agriculture. 15-26. En: T.A. Thorpe (Ed.) Frontiers
. of Plant Tissue Culture IAPTC Calgary.
- National Academy of Science, 1975. Underexploited
. tropical plants with promising economic
. . . . value.NAS,Washington, D.C.
- Osborne, R. and J. van Staden, 1987. In vitro
. Regeneration of Stangeria eriopus. HortScience .
. 22: 1326.
- Raghavan, V.,and J.G. Torrey. 1964. Inorganic and
. nitrogen nutrition of the seedlings of the orchid
Cattleya. Amer. J. Bot. 51: 264-274.
- Rao, A.N., 1977, Tissue culture in the orchid industry, .
. En: J.Reinert and Y.P.S. Bajaj (Eds.) Applied and
. fundamental aspects of plant cell, tissue and . .
. organ culture, Springer Verlag, N.Y.

- Raven, P. 1986. 60,000 plants under threat. Threatened .
Plants Newsletter No. 16: 2-3
- Rawn, 1983 . Biochemistry, Harper and Row
- Reinert, J. et al., 1977. Aspects of Organization
Organogenesis, Embryogenesis, Cytodifferentiation.
En: H.E. Street (Ed.) Plant Tissue and Cell . .
Culture. Botanical Monographs. Vol. 11, Blackwell .
Scientific publications, Oxford, London.
- Rubluo, A. et al., 1989. In vitro seed germination and .
re-Introduction of *Bletia urbana* (Orchidaceae) . .
in its natural habitat. *Lindleyana* 4: 68-73.
- Rzedowsky, J. 1978. Vegetación de México, Limusa, México.
- Sagawa, Y. and Kunisaki. 1984. Clonal Propagation .
Orchids. En: I. K. Vasil (Ed.). Cell Culture and .
Somatic Cell Genetics of Plants vol. 1 Laboratory .
Procedures and Their Applications. Academic Press.
Florida USA.
- Simmons, J. B., 1976. The Botanical Garden as a documented
living collection and its role in plant resources
maintenance *Optima* leaflet. 18: 1-12.
- Skoog, F. and C.O. Miller, 1957. Chemical regulation of .
growth and organ formation in plant tissues . . .
cultured in vitro *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118-
130.
- Street, H.E. (Ed) 1977. Plant Tissue and Cell Culture. . .
Botanical Monographs. Vol 11. Blackwell Scientific
Publications, Oxford, London.

- Thorpe, T.A. 1978. Physiological and Biochemical Aspects .
of Organogenesis in vitro. 49-58. En: T.A. Thorpe.
1978 (Ed) Frontiers of Plant Tissue Culture .
1978. Calgary IAPTC.
- Toledo, V.M., 1988. La diversidad biológica de México, .
Ciencia y Desarrollo, Año XIV No. 81: 17-30.
- Vajrabhaya, T. 1977. Variations in clonal propagation. .
En: J. Arditti (Ed.). Orchid Biology, reviews and
perspectives, I. Cornell Univ. Press, Ithaca and
London.
- Veyret, Y. 1974. Development of the Embryo and the Yung .
Seedlings stages of the orchids. En: C.L. Withner .
(Ed) The Orchids Scientific Studies. John Wiley .
and Sons New York.
- Vovides, A.P. and A. Gómez Pompa. 1977. The Problems of .
Threatened and Endangered Plant species of México.
En: Extinction is Forever, INIREB. The New York .
Botanical Garden 77-88.
- Vovides, A.P. 1989. Problems of Endangered species,
conservation in Mexico: Cycads an example.
Encephalartos No. 20: 29-35
- Wilson, R., 1984. Population and Natural Resources: A
statement (IUCN/IPPF). Earthwatch No. 16: 1-7
- Wilson, E.O., 1989. Threats to biodiversity, Scientific
American 261:108-116.
- Wochok, Z.S., 1981. The role of tissue culture in
preserving threatened and endangered plant
species, Biological conservation 20: 83-89.

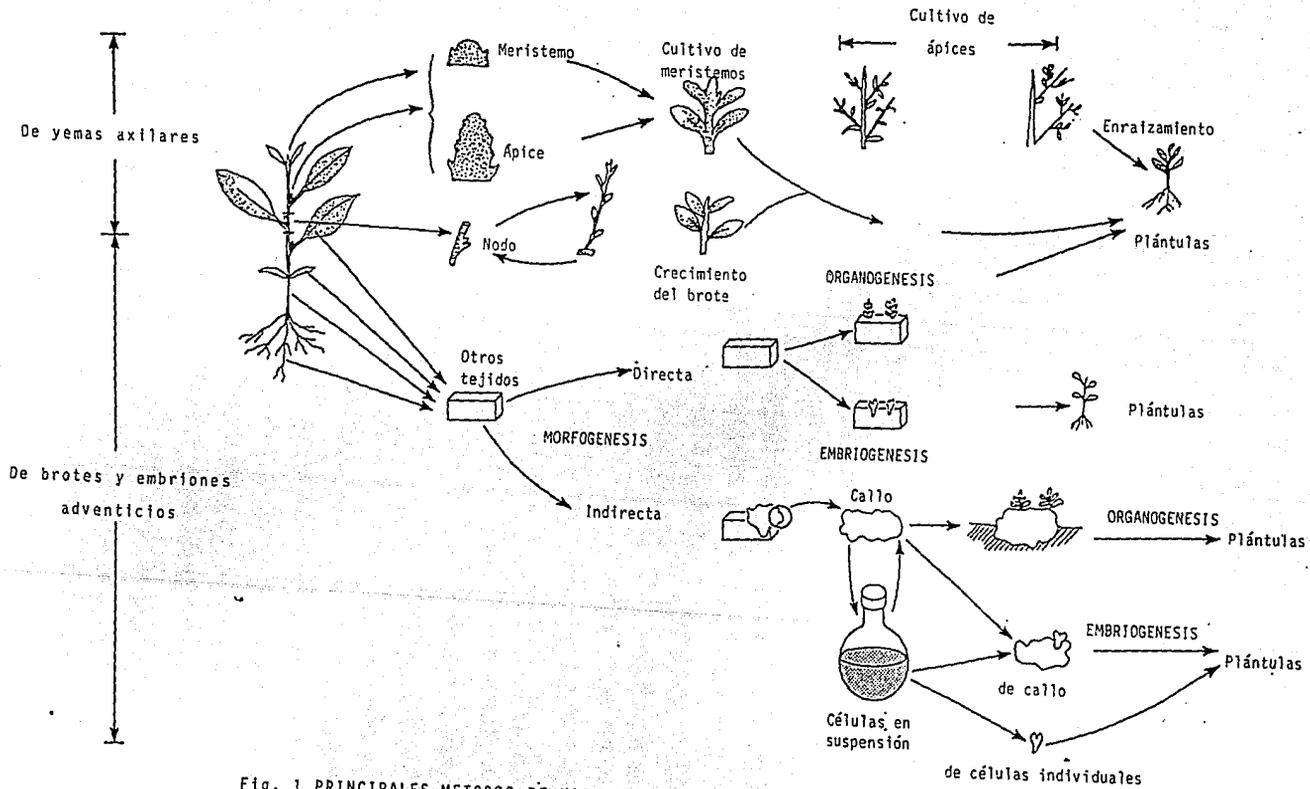


Fig. 1 PRINCIPALES METODOS DE MICROPROPAGACION (George y Sherrington, 1984).

Tabla 1. CONDICIONES DE CULTIVO EMPLEADAS PARA LA GERMINACION ASIMBIOTICA DE LAS SEMILLAS.

ESPECIE Y MEDIO DE CULTIVO	CONDICIONES DE INCUBACION
<u>Encyclia vitellina</u>	
VW.....	1,2,4
KC.....	1,2,4
KC+vitB5.....	1,2,4
KC+vitB5+3%sac.....	4*
KC+vitB5+3%sac+HC.....	1,2,4,4*
KC+vitB5+Glu.....	2
<u>Mormodes badia</u>	
VW.....	1,2,3,4
KC+vitB5.....	1,2,3,4
KC+vitB5+3%sac.....	1,2,3,4
KC+vitB5+3%sac+HC.....	1,4*
KC+vitB5+Glu.....	1
<u>Mormodes rosilloana</u>	
KC+vitB5+Glu.....	1

(1) Fotoperiodo 16 h luz 28±2°C 1000 Lux; (2) Oscuridad 28±2°C;
 (3) Luz continua 28±2°C 3000 Lux; (4) Luz continua 25±2°C 1000 Lux;
 (4*) Luz continua roja 25±2°C 1000 Lux; (KC) Knudson C; (VW) Vacin & Went;
 (vitB5) Vitaminas de medio B5; (sac) Sacarosa; (HC) Hidrolizado de Caseina 100 mg/l;
 (Glu) L-Glutamina 15mg/l.

Tabla 2. TRATAMIENTOS PARA INDUCIR BROTAACION MULTIPLE EN DIFERENTES MEDIOS Y DESARROLLO DE PLANTAS.

Especie	Protocormos	Secciones de protocormos	Nudos	Desarrollo de plantas
<i>E. vitellina</i>	KC+vitB5 800 Lux, 1 semana 20±3°C -50 Lux 4 semanas -50 Lux 8 semanas 20±3°C	-	-	-KC+10% micronutrientes MS+ Glu+ vitB5 Fotoperiodo 16 h, 28±2°C
<i>M. badia</i>	-	-KC+vitB5+BA 5µM+ANA 0.1µM -KC+vitB5+BA 5µM+ANA 0.1µM +Glu. Fotoperiodo 16 h, 28±2°C	-KC+vitB5+BA 5µM+ANA 0.1µM + Glu. Fotoperiodo 16 h, 28±2°C	-KC+vitB5+BA 5µM+ANA 0.1µM + Glu. Fotoperiodo 16 h, 28±2°C
<i>M. rosilloana</i>	-KC+vitB5+Glu Fotoperiodo 16 h, 28±2°C	-	-	-KC+vitB5+Glu Fotoperiodo 16 h, 28±2°C

(KC)Knudson C; (Glu)L-Glutamina 15 mg/l.

Tabla 3. GERMINACION DE LAS SEMILLAS Y DESARROLLO DE PLANTAS

Especie y medio	Condiciones de cultivo	Germinación	Tiempo de aparición en semanas de:			Observaciones
			protocormos	brotos	raíces	
<u>Encyclia vitellina</u>						
VW.....	1,2,4	0	0	0	0	
KC.....	1,2,4*	<1	5	10	14subcultivados en medio fresco forman plantas completas
KC+vitB5+2.5% sac.....	1,2,4	33.9	8	10	20subc. en medio fresco y cond. de incubacion (2) forman BM subc. para plantas completas
KC+vitB5+Glu.....	2	0	0	0	0	
KC+vitB5+HC+3% sac.....	1,2,4,4*	<1	8	12	15	
KC+vitB5+3% sac.....	4*	<1	6	8	17	
<u>Mormodes badia</u>						
VW.....	1,2,3,4*	<1	16	-	-protocormos seccionados y
KC.....	1,2,3,4	<1	12-56	60	64	subcultivados para brotación
KC+vitB5.....	1,2,3,4	<1	24-29	-	-multiple
KC+vitB5+Glu.....	1	0	0	0	0	
KC+vitB5+HC+3% sac.....	1	0	0	0	0	
<u>Mormodes rosilloana</u>						
KC+vitB5+Glu.....	1	40	7	9	11masas de protocormos con 2-5 brotes

(1) Fotoperiodo 16 h luz 28±2°C, 1000 Lux; (2) Oscuridad 28±2°C; (3) Luz continua 28±2°C, 3000 Lux; (4) Luz continua 25±2°C 1000 Lux; (4*) Luz continua roja 25±2°C 1000 Lux; (˘) Condición en la que germinaron las semillas; (Glu) L-Glutamina 15mg/l; (HC) Hidrolizado de caseína 1000 mg/l; (sac) Sacarosa; (BM) Brotación Multiple; (KC) Knudson C+2.5% sac.; (VW) Vacin y Went.

Tabla 4. RESPUESTA in vitro DE Encyclia vitellina D. GERMINADOS EN KC+VIT85+ 2.5% sac. EN OSCURIDAD 28±2°C (8 SEMANAS); REINCUBADOS A 20±5°C Y 800 LUX 1 SEMANA Y POSTERIORMENTE SUBCULTIVADOS EN EL MISMO MEDIO E INCUBADOS A 50 LUX, 20±3°C

Tiempo de incubacion (semanas)	N° P	NP/PBM (X)	% BM	PI/P (%)	NTP NB+PI	RANGO BM	% PR
4	276	673/170 (X=3.9)	80%	106/276 (20%)	779 673+106	2-10	343.4%
8	1359	3728/757 (X=4.9)	70%	602/1359 (40%)	4545 3728+602	2-15	311%

(P)Protocormos considerados como explante inicial;(NB)Numero de brotes;(PBM)Protocormos con brotacion multiple;
(BM)Brotacion multiple;(PI)Plantulas desarrolladas directamente;(NTP)Numero total de plantulas;(PR)Productividad/fs.

Tabla 5. RESPUESTA in vitro DE SECCIONES DE PROTOCORMOS DE Morades badia INCUBADOS EN FOTOPERIODOS DE 16 H LUZ, 28±2°C 1000 LUX.

Medio	S	Tiempo de incubacion (semanas)	NE	SR (%)	R (%)	NB/EBM (x)	%EBM	P (%)	NSb	TB NB+HP (x)	NER(x)	%PR
KC+vitB5+ Glu SumBA+ 0.1µM ANA	A1	12	14	0	14 (100%)	47/11 (4.2)	78.6%	3 (21.3%)	0	50 47+3 (x=3.6)	0	357%
	A2	28	35	20 (58%)	15 (42%)	38/10 (3.8)	66%	5 (33.3%)	2	43 38+5 (x=2.9)	3(3.6)	286.7%
	A3	20	31	1 (3.2%)	30 (97.8%)	73/23 (3.1)	76.6%	7 (23.4%)	25	80 73+7 (x=2.7)	11(3.7)	270%

KC)Knudson C;(S)Subcultivo;(NE)Numero de explantes;(SR)Sin respuesta;(R)Respuesta;(NB)Numero de brotes;(EBM)Explantos con brotacion multiple;(HP)Numero de plantulas;(%EBM)Porcentaje de brotacion multiple;(NSb)Numero de pseudobulbos;(TB)Total de brotes;(PR)Produccion de plantas.

Tabla 6. RESPUESTA in vitro DE NUDOS DE Mormodes badia EN KC+VIT85+ BAUM+ ANA 0.10M+ 15mg/l L-Glu

INCUBADOS EN FOTOPERIODO DE 16 H LUZ 28±2°C, 1000 LUX.

Tiempo de incubacion (semanas)	NE	SR (%)	R (%)	NB/EMB (x)	%BM (%)	P (%)	NSb (%)	TB (NB+HP)	NER (x)	%PR
8	66	19 (26.5%)	47 (73.5%)	58/22 (2.6)	49%	25 (50.7%)	7 (10.4%)	83 (58+25)	14	130%
12	146	51 (33.3%)	95 (66.7%)	131 (3.1)	70%	53 (30%)	30 (12.4%)	184 (131+53)	18	132%
20	180	43 (23.8%)	137 (76.2%)	310/92 (3.36)	67.1%	45 (19.7%)	55 (11.1%)	355 (310+45)	42	245%

KC)Knudson C;(NE)Numero de explantes;(SR) Sin respuesta;(R) Respuesta;(NB) Numero de brotes;(EMB) Explantes con brotacion multiple;(HP)Numero de plantulas;(%BM)Porcentaje de brotacion multiple;(NSb)Numero de pseudobulbos;(TB)Total de brotes;(PR)Produccion de pl.;(NER)Numero de explantes con raiz.

Tabla 6a. PROMEDIOS Y DESVIACIONES ESTANDAR DEL: NUMERO DE BROTES POR EXPLANTE

Y PRODUCCION DE PLANTAS EN NUDOS DE Normodes badia

Tiempo	8 semanas	12 semanas	20 semanas
Explantes	66	140	179
Promedio de br. por explante	1.78±.31	1.8±.75	3.03±1.5
Produccion de plantas	130.4±20.4	132.5±76.2	245.8±150

(br) brotes.

APENDICE

MEDIO BASAL KNUDSON C (KC) (1946)

REACTIVO	g/l
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1.0
KH ₂ PO ₄	0.25
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.50
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.025
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.0075
SACAROSA	20.0
BACTO-AGAR	8.0
AGUA DESTILADA.. aforar a.....	1000 ml
pH	5.0

MEDIO VACIN Y WENT (VW) (1949)

(MODIFICADO)

REACTIVO	g/l
Ca ₃ (PO ₄) ₂	0.25
KNO ₃	0.525
KH ₂ PO ₄	0.25
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25
(NH ₄) ₂ SO ₄ .H ₂ O	0.500
TARTRATO FERRICO	0.028
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.0075
SACAROSA	20.0
AGAR	8.0
pH	5.0

MICRONUTRIENTES DE MURASHIGE Y SKOOG (MS) (1962)

(% DE CONCENTRACION ORIGINAL)

REACTIVO	litros x 100 ml -
H ₃ BO ₃	mg 0.62
MnSO ₄ .4H ₂ O	2.23
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.86
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0025
KI	0.083

VITAMINAS DEL MEDIO B5 (Gamborg et al, 1968)

REACTIVO	litros x 100 ml -
ACIDO NICOTINICO	mg 1.0
PIRIDOXINA.HCl	1.0
TIAMINA.HCl	10.0