

131
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

FALLA DE ORIGEN

REGENERACION *in vitro* A PARTIR DEL CULTIVO DE APICES DE
TALLO DE *Oncidium stramineum* BATEM. ex LINDL.
(ORCHIDACEAE), ESPECIE MEXICANA EN PELIGRO DE EXTINCION.

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S T A R E S T U D I O S P R O F E S I O N A L E S

LUZ MARIA RANGEL GUERRERO



MEXICO, D.F. FACULTAD DE CIENCIAS
DIRECCION ESCOLAR

OCTUBRE 1995

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

Gracias a Dios



y gracias a la vida



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron LA pasante(s) LUZ MARIA RANGEL GUERRERO

con número de cuenta 8116322-5 con el Título: REGENERACION in vitro A PARTIR DEL CULTIVO DE APICES DE TALLO DE Oncidium stramineum BATEM. ex LINDL. (ORCHIDACEAE), ESPECIE MEXICANA EN PELIGRO DE EXTINCION.

Otorgamos nuestro **Voto Aprobatorio** y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de BIOLOGO

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
DR.	VICTOR MANUEL	CHAVEZ AVILA	<i>[Firma]</i>
Director de Tesis	MARIA HILDA	FLORES OLVERA	<i>[Firma]</i>
M. EN C.	ALEJANDRO	MARTINEZ PALACIOS	<i>[Firma]</i>
M. EN C.	AIDA MARISA	OSUNA FERNANDEZ	<i>[Firma]</i>
Suplente BIOL.	MARIA DEL CARMEN	CORONA CORONA	<i>[Firma]</i>
Suplente			

La presente investigación fué realizada en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Victor Manuel Chávez Avila

DEDICATORIA

A quienes amo admiro y respeto
mis padres:

Elvira Guerrero y Ernesto Rangel

que con su comprensión y cariño han sembrado en mi la confianza que
me ha permitido avanzar en la vida

A mi bebé: Guillermo con todo el amor del mundo

A mi esposo: Guillermo Barrera

por su amor, paciencia y completa entrega

A mis hermanas: Olivia, Rosa Elvira y Elizabeth y muy especialmente a mi
hermano Raúl por ser siempre mi estímulo y mi guía en cada logro de mi
vida profesional y personal

A mi abuelita: Ma. de la Luz Salazar a sus 84 años

A todos mis sobrinos como un aliciente al camino que falta por recorrer

A mis tíos, primos, amigos y demás familiares por las experiencias
compartidas a través de los años y que hemos atesorado como hermosos
recuerdos

A las familias Rangel Ramírez, Argumedo Guerrero, Barrera Martínez y
Mendoza Barrera por su amistad y cariño

A todos ellos les dedico el esfuerzo de este trabajo y lo que representa
para mí, como un homenaje de lucha y tenacidad ante las condiciones
adversas de la vida

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Víctor Manuel Chávez Avila, excelente maestro y mejor amigo, quien siempre ha sido un ejemplo de admiración en mi desarrollo profesional, gracias por su valiosa ayuda en las innumerables horas dedicadas para la elaboración, discusión y revisión detallada de este trabajo.

Al M. en C. Alejandro Martínez Palacios, quién me proporcionó el material biológico y la idea original para desarrollar la presente investigación con plantas de orquídeas, agradezco su amistad, apoyo y estímulo constante para la realización de esta tesis.

A la Biól. Ma. de los Angeles Aida Téllez Velasco, por su amistad apoyo y valiosa ayuda en la revisión bibliográfica y en el tema de orquídeas, basada en su amplio conocimiento y experiencia en estas plantas.

Al Biól. Martín Mata Rosas por su amistad, sugerencias y ayuda en la edición por computadora.

Al Director del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del IB-UNAM. Dr. Abraham Rubluo Islas, a la Dirección del Jardín Botánico de este mismo Instituto Dr. Robert Bye Boettler, así como a la Dirección del Instituto de Biología, Dr. Antonio Lot Helgueras, por permitirme usar las instalaciones con el equipo y materiales diversos, necesarios para desarrollar la presente investigación.

Mi más sincero agradecimiento a los miembros del jurado dictaminador por la revisión de este trabajo, que sin duda alguna mejoró con sus comentarios:

Dr. Victor Manuel Chávez Avila

Dra. María Hilda Flores Olvera

M. en C. Alejandro Martínez Palacios

M. en C. Alda Marisa Osuna Fernández

Biól. María del Carmen Corona Corona

Esta tesis me dió la oportunidad de conocer y convivir con gente maravillosa, mis compañeros y amigos del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, a todos ellos agradezco las atenciones que tuvieron conmigo durante mi estancia en el laboratorio.

Extiendo mi agradecimiento a mis amigas y compañeras de trabajo del Area de Difusión y Educación del Jardín Botánico, Carmen Cecilia, Linda, Elia, Lourdes y la maestra Edelmira que participaron conmigo en este trabajo de diferentes maneras.

INDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN 1

I. INTRODUCCION 3

 I.1 Incremento poblacional 3

 I.2 Deforestación 4

 I.3 Contaminación 5

 I.4 Limitado número de cultivos 7

 I.5 Tráfico ilegal de especles vegetales 8

 I.6 Conservación in situ y ex situ 10

 I.7 Bancos de semillas y campos de bancos genéticos 11

 I.8 Cultivo de Tejidos Vegetales 12

 I.9 Características generales de la familia Orchidaceae 15

 I.9.1 Problemas de conservación en orquídeas 18

 I.10 Clasificación de Oncidium stramineum

 Batem. ex Lindl. 19

 I.11 Descripción botánica y distribución de Oncidium
 stramineum 19

 I.12 Importancia Económica de Oncidium stramineum 21

II. ANTECEDENTES 22

 II.1 Propagación de Oncidium stramineum 22

 II.1.1 Características de cultivo 22

 II.2 Germinación asimbiótica de semillas de orquídeas 23

 II.3 Propagación clonal y masiva in vitro 25

 II.4 Cultivo in vitro de ápices 26

III. OBJETIVOS	28
IV. MATERIALES Y METODOS	29
V. RESULTADOS	33
V.1 Medio Líquido	33
V.2 Medio Sólido	35
V.3 Subcultivo de medio líquido a sólido	37
VI. DISCUSION	39
VII. CONCLUSIONES	46
VIII. FIGURAS	47
IX. APENDICES	48
X. TABLAS	50
XI. GRAFICAS	54
XII. BIBLIOGRAFIA	57

ABREVIATURAS

2,4-D	Acido 2,4 - Diclórofenoxiacético
B5	Medio de cultivo Gamborg, Miller y Ojima, 1968
B.M.	Brotación Múltiple
B.G.C.I	Botanic Garden Conservation International. (Organización Internacional para la Conservación en Jardines Botánicos).
C.I.T.E.S	Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres).
C.T.V.	Cultivo de Tejidos Vegetales
I.U.C.N	International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales).
K	Kinetina, 6- Furfurilaminopurina
KC	Medio nutritivo Knudson "C" (1946).
KC-E	Medio nutritivo KC enriquecido (Martínez, 1991) con micronutrientes y la adición de vitaminas del medio B5.
MS	Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962).
PLB's	Protocorm Like Bodies (cuerpos en forma de protocormos).
rpm	Revoluciones por minuto.
W.W.F	World Wildlife Found. (Fundación Mundial para la Vida Silvestre).

**REGENERACION *in vitro* A PARTIR DEL CULTIVO DE APICES DE TALLO DE
Oncidium stramineum BATEM. ex LINDL. (ORCHIDACEAE), ESPECIE MEXICANA
EN PELIGRO DE EXTINCION.**

RESUMEN

En el presente trabajo se logró la regeneración de plantas de orquídeas bajo condiciones *in vitro* a partir de ápices de tallo de *Oncidium stramineum* Batem ex Lindl. (Orchidaceae), especie endémica del Estado de Veracruz, México.

Se utilizó el medio de cultivo KC-E sólido y líquido, adicionado de las combinaciones de los fitorreguladores del crecimiento 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y 6-furfurilaminopurina (cinetina, K). Las primeras respuestas morfológicas se manifestaron después de 2 a 3 semanas de iniciados los cultivos, con la formación de masas celulares semiesféricas que resultaron en cuerpos semejantes a protocormos (PLB's) y considerados por ello como embriones somáticos (adventicios), éstos protocormos al subcultivarse en medio KC-E sin hormonas presentaron la capacidad de generar nuevos PLB's, que quedaron unidos y después de 16 semanas se desarrollaron en plántulas que alcanzaron tamaños de 1-2 cm de longitud con raíces de 3-6 mm en promedio. La formación de PLB's ocurrió en todos los tratamientos y no dependió de los fitorreguladores pues aún en su ausencia hubo regeneración, sin embargo éstos sí tuvieron influencia en el número de los brotes y su crecimiento.

El mayor número de PLB's se formó en los tratamientos con K 1 mg/l sin 2,4-D, tanto en medio líquido (79 brotes) como en sólido (89 brotes). Los mejores resultados se obtuvieron en cultivos iniciados en medio líquido seguidos del subcultivo de PLB's o masas de protocormos a medio sólido donde continuaron su desarrollo. La inducción y el desarrollo de los PLB's en plántulas completas

(aún el enraizamiento) ocurrió en el medio inicial (de Inducción) con hormonas, no fue requisito un segundo medio de maduración (sin hormonas), sin embargo éste favoreció el crecimiento de los brotes.

En términos generales, una comparación de los sistemas de cultivo ensayados indicó que en los medios sólidos se logró la morfogénesis en menor tiempo pero también con un menor número de regenerantes, en tanto que en los medios líquidos, la morfogénesis tomó más tiempo pero se formaron PLB's en un mayor número. La combinación de estos dos sistemas iniciando los cultivos en medio líquido y el subcultivo posterior a medio sólido rindió los mejores resultados. Así entonces el objetivo planteado en la presente investigación se cumplió, además la utilización de ésta técnica se recomienda para la propagación, conservación y aprovechamiento de las orquídeas, las cuales son especies en gran riesgo de extinción.

I. INTRODUCCION

El estado y distribución de especies y hábitats, así como el manejo tanto in situ como ex situ de la biodiversidad del Planeta, constituyen actualmente en conjunto una de las principales preocupaciones de la humanidad, ya que todos los ecosistemas se encuentran interrelacionados y todo cambio en uno de ellos repercute tarde o temprano en los demás.

Por desgracia las alteraciones y la pérdida del equilibrio en la naturaleza están ocurriendo a una gran velocidad, mucho mayor que la que requieren los sistemas biológicos para restablecer su orden natural. En forma lamentable son las distintas actividades del hombre las que han puesto en serio peligro de extinción, prácticamente a todas las formas de vida del Planeta (Ehrlich y Wilson, 1991). Entre tales actividades las más notorias y dañinas están: el incremento poblacional; la tala y quema desmedida de bosques y selvas para ampliar las áreas agrícolas, ganaderas y urbanas; la contaminación de suelos, cuerpos de agua y atmósfera por desechos industriales y quema de combustible fósil; el acentuado aprovechamiento de un número muy limitado de cultivos de uso alimenticio, medicinal y en otras industrias; el desconocimiento de las propiedades y beneficios que podría obtener de las plantas hasta ahora consideradas sólo como malezas; el saqueo y tráfico ilegal de plantas, animales colectados en poblaciones silvestres.

1.1 Incremento poblacional. En el año 1800 la población mundial llegó a mil millones de habitantes, en 1987 superó los 5000 millones (Keyfitz, 1989) y actualmente tiene un incremento diario de 250,000 nuevos individuos, la población llegará a diez mil millones en el año 2046 y entre 12 y 14 mil millones en el año 2100 (Hinrichsen, 1990; Soulé, 1991). Estas cifras claramente indican

que día a día aumentan las demandas de más recursos que se extraen de la naturaleza y este crecimiento continuará hasta que la humanidad decida reducir su número a niveles compatibles con la restauración de los procesos bióticos.

1.2 Deforestación. Datos proporcionados por la I.U.C.N., en 1976 para las áreas tropicales, indicaban que cada minuto que transcurría se destruían 21 ha (Vovides, 1989) ahora con métodos más mecanizados y a sólo 15 años de distancia se talan en estas áreas unos 20 millones ha/año, es decir más de 30 ha/minuto (Reid, 1992).

El bosque atlántico, en el este de Brasil, es uno de los ecosistemas más amenazados del mundo, originalmente la selva cubrió un millón de km², pero ahora sólo queda el 4%, debido a presiones demográficas y a la explotación de recursos naturales según datos de B.G.C.I.

De acuerdo a cifras oficiales (1981-1985), México ocupaba el tercer sitio en Latinoamérica con una tasa de deforestación de 500,000 ha/año, sin embargo, tan solo por la expansión ganadera entre 1981 y 1983 hubo incrementos de 1-2 millones ha/año, si a esta cifra se agregan las de tierras para la agricultura, la de pérdida por incendios forestales y el crecimiento de zonas urbanas, es posible considerar conservadoramente en 1 millón ha/año la vegetación natural perdida (Toledo, 1988). A nivel mundial se estima que para el año 2100 la deforestación habrá eliminado probablemente casi todos los bosques tropicales fuera de las reservas o áreas protegidas de la naturaleza.

La deforestación y la quema de combustibles fósiles están aumentando la cantidad de carbono atmosférico en unos 3000 millones de toneladas métricas/año, el aumento de CO₂ y otros gases como el metano, los clorofluorocarbonos, los óxidos de nitrógeno y el ozono de la baja tropósfera

aprisionan el calor que penetra al planeta y están promoviendo un aumento en la temperatura (efecto Invernadero). La mayoría de los investigadores consideran que está ocurriendo un cambio en el clima por un calentamiento que llegará a ser de 3°C, junto con una disminución en la precipitación pluvial en el interior de los continentes y un ascenso en el nivel del mar que puede llegar a ser de 0.2 a 1.5 m, por lo tanto se espera que el área cultivable para cereales se desplazará hacia el norte varios cientos de kilómetros. Estos cambios que ya están ocurriendo se habrán concretado en 50 o 100 años (Schneider, 1989; Hinrichsen, 1990).

1.3 Contaminación. Después de muchos años en que los gobiernos suprimieron la información sobre la contaminación del medio ambiente y ahora sin dejar de tratar de manipular la información, pero ya con la confianza perdida por parte de la gente, estamos conociendo la realidad acerca de la calidad del aire que respiramos y del agua que bebemos. En la lista de consecuencias que puede ocasionar la contaminación, los efectos sobre la salud humana es lo que más sensibiliza a la gente, sin embargo, también deberían ser señales de gran alarma los daños sobre los recursos naturales, así por ejemplo en el sur de Polonia muchos niños tienen ya en sus cuerpos sustancias carcinogénicas, el río Vistula ha sido tan contaminado por procesos de extracción en minas de carbón que sus aguas resultan demasiado ácidas aún hasta para enfriar maquinaria (Anónimo, 1990). Respirar el aire de la Ciudad de México resulta equivalente a fumar 2 paquetes de cigarrillos diariamente (Hinrichsen, 1990). Virtualmente en todos los países europeos la sobreutilización de pesticidas y fertilizantes en la agricultura está ocasionando la contaminación del agua y suelos.

El río Danubio descarga al Mar Negro cada año casi 1.8 millones de toneladas métricas de sustancias químicas utilizadas en la agricultura (Davey, 1991; Hinrichsen, 1991).

La combustión de energéticos fósiles ha provocado parte de la acidificación de suelo y agua, en Italia se considera que hasta un 75% de los bosques en el noreste de los Alpes están afectados por la lluvia ácida no sólo por el contacto con ésta sino también por la acidez del suelo.

En 1990, científicos de la Academia Soviética de Ciencias declararon 16% de la Ex Unión Soviética "zona de desastre ecológico" lo cual es un área aproximadamente del tamaño de Europa Occidental. En 100 ciudades industriales la contaminación del aire supera ahora 10 veces los límites recomendados por la Organización Mundial de la Salud; en 16 ciudades el nivel es 50 veces superior. El río Techa y lagos cercanos están contaminados por desechos radioactivos (Davey, 1991).

Durante la Guerra en el Golfo Pérsico se derramaron al mar entre 3 y 6 millones de barriles de petróleo, esta cantidad es la mayor registrada hasta ahora entre los reportes de este tipo. Formó una gruesa capa sobre la superficie del agua en aproximadamente 460 km de costa. Entre los hábitats más severamente dañados están los manglares, totalmente cubiertos por el petróleo; murieron entre 20,000 y 30,000 aves; para muchas otras aves migratorias se perdieron las áreas donde se alimentaban durante su desplazamiento; y acarrió una muerte masiva de invertebrados (Preen, 1991; Bhalla, 1991). La temperatura así como la intensidad de la luz solar en la región descendieron notablemente a consecuencia de la combustión de los pozos petroleros (Kemf, 1991).

Actualmente se considera que la contribución per capita a la contaminación atmosférica (y por lo tanto al cambio global del clima) es mayor por varios órdenes de magnitud por parte de los ciudadanos que viven en países

Industrializados que de aquellos en naciones pobres (Ehrlich, 1981 citado por Soulé, 1991).

1.4 Limitado número de cultivos. Se considera que existen unas 250,000 especies de plantas con semillas y que el hombre a lo largo de su historia ha utilizado entre 3000 y 7000 en su alimentación, pero con el paso de los siglos ha utilizado un número cada vez menor, hoy la mayor parte de la población se alimenta de sólo unos 20 cultivos (Moore, 1988; MacKnight, 1988).

La humanidad y el resto de los organismos heterótrofos se benefician de las especies vegetales poco conocidas para la Ciencia, a través de "servicios ecológicos" como el control de plagas (Wilson, 1984), la remoción de CO₂ y oxigenación de la atmósfera, son el soporte de todas las formas de vida del Planeta y todo esto gracias al proceso fotosintético que realizan.

El hombre podría encontrar en estas especies vegetales nuevos y mejores alimentos y otros productos industrializables. El U.S. National Cancer Institute ha empezado a explorar productos naturales y analiza unas 10,000 sustancias al año buscando actividad contra cáncer y virus del SIDA (Wilson, 1989).

La especie silvestre de Madagascar, Ficus polyphlebia tiene propiedades espasmódicas y es utilizada en la herbolaria tradicional para inducir abortos como medio de control de la natalidad.

La orquídea Angraecum eburneum tiene propiedades antiespasmódicas y es utilizada para evitar abortos.

El único género Aloe que se encuentra en Madagascar, considerado especie nueva presenta propiedades antibacterianas y antivirales, y es utilizada en la cura de heridas infectadas.

Otra especie originaria de Madagascar Catharanthus roseus es utilizada para el tratamiento de leucemia y la enfermedad de Hodgkins, esta planta por sí sola

genera cerca de 100 millones de dólares/año. Esto sin duda representa grandes beneficios económicos para la industria, sin embargo no para Madagascar, de cuyos habitantes nació el conocimiento original del aprovechamiento de esta planta.

1.5 Tráfico ilegal de especies vegetales. A pesar de las legislaciones nacionales y procedimientos policíacos para obligar a respetar la Convención sobre el comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, C.I.T.E.S.) muchos y bien organizados traficantes y coleccionistas privados continúan importando ilegalmente especies raras y amenazadas que están protegidas, movidos por altos incentivos financieros o por el deseo de poseer plantas o animales muy escasos en la naturaleza.

Después de Estados Unidos y Japón, la Comunidad Económica Europea es la mayor región importadora de vida silvestre y un re-exportador principal de sus productos hacia Estados Unidos, para tratar de frenar esta situación, la W.W.F. (World Wildlife Found), estimula la conservación de la diversidad biológica a través del monitoreo de su uso y tráfico, así como la documentación de los efectos de tráfico a través de su red TRAFFIC (Trade Records Analysis of Fauna and Flora In Commerce), con oficinas en Japón, E.U., Australia y Sudamérica, e invierte para ello 1,000,000.00 dólares/año. Entre los casos de 1990 en que TRAFFIC logró detener el envío de especies silvestres y sus productos, mencionaremos algunos ejemplos:

- El científico mexicano y criador de aves, Jesús Estudillo López fue arrestado al tratar de sacar 22 aves de Brasil.
- Dos monjas procedentes de Zaire fueron detenidas en el aeropuerto de Milán con 17 kg de objetos de marfil tallado.

- Fue detenido Hans Herman, quien es uno de los principales traficantes Internacionales de orquídeas (Kemf, 1990).
- La especie de orquídea, Paphiopedilum emersonii del sur de China, identificada en 1966, inmediatamente fué colectada y miles de ejemplares enviados a Hong Kong, Taiwan y Tailandia donde horticultores sin escrúpulos se encargaron de otorgar certificados de C.I.T.E.S.
- En 1989 un Inglés, hombre de negocios fué sentenciado a 12 meses de cárcel por traficar orquídeas silvestres de Brasil hacia Inglaterra; se le encontraron varios cientos de plantas incluyendo 365 especies amenazadas, entre ellas Paphiopedilum druryi, ahora considerada extinta en la naturaleza. Subsecuentemente el traficante fué dejado en libertad al pagar una multa de 4,240.00 dólares (Allan, 1989).
- Vovides (1989) cita el caso en que un millón de plantas entre orquídeas, cactáceas y cicadáceas fueron sacadas ilegalmente de México.
- SEDUE (1991) reportó que en México entre 1989 y febrero de 1991, decomisaron cerca de 640,000 plantas entre orquídeas, cactáceas, zamiáceas, agaváceas, bromeláceas y liliáceas.

Ante todas estas acciones del hombre ha sido necesario que también implemente medidas para proteger la vegetación natural.

México es uno de los tres países de mayor diversidad a nivel mundial, presenta intensos procesos de destrucción de los hábitats, es además uno de los países más atrasados en términos de conservación de recursos bióticos (Toledo, 1988).

Debido a esto, existen entre otras tareas algunas formas básicas de tratar de conservar los recursos naturales esto es, en la naturaleza o in situ o bien a través de colecciones ex situ, fuera del hábitat de la planta, generalmente llevada a cabo en jardines botánicos, bancos de semillas, en campos de bancos

genéticos o por la técnica de cultivo *in vitro*, conocida también como cultivo de tejidos vegetales.

1.6 Conservación in situ y ex situ

La mayor parte de la conservación in situ se lleva a cabo en áreas protegidas, especialmente en parques nacionales y reservas naturales. El objetivo final de cualquier programa de conservación vegetal es la preservación de la biodiversidad de las especies vegetales en la naturaleza, de tal forma que puedan reproducirse naturalmente por sí mismas. La conservación in situ permite también la continuación del proceso evolutivo de las plantas y asegura la conservación de la compleja "red de vida" como son las interacciones entre plantas y animales y su biósfera, que es una parte vital de la supervivencia del hábitat.

En 1980, la I.U.C.N., reportó que sólo el 0.3% de México tenía áreas naturales realmente protegidas. En Latinoamérica, ocupa el décimo sitio en términos de superficie protegida y el vigésimo respecto al porcentaje dedicado a conservar recursos bióticos. En México existen 48 áreas protegidas con reconocimiento oficial; 14 con decreto en trámite y 25 propuestas, que totalizan 744 millones ha (3.76%) del territorio nacional, sin embargo, si se restan las superficies de las áreas en proyecto, las cifras se reducen a 1.6 millones ha, es decir sólo 0.8%, y de éstas, pocas reúnen las condiciones requeridas por la I.U.C.N., para la efectiva protección de flora y fauna. Más aún, debido a que las áreas protegidas no fueron elegidas siguiendo un criterio biogeográfico, no alcanzan a cubrir las áreas con la mayor riqueza de especies y endemismos (Toledo, 1988).

En los Jardines Botánicos se tienen varias colecciones de especies vegetales y se cultiva un número enorme y variado de plantas, incluyendo muchas especies

que se encuentran en peligro de extinción en la naturaleza, a este tipo de colecciones se le conoce también como *ex situ*, porque las plantas se encuentran fuera de su hábitat. Existen alrededor de 1500 jardines botánicos en el mundo, muchos de los cuales están cada vez más comprometidos en la tarea de la conservación de la diversidad vegetal a través de un plan estratégico conocido como Organización Internacional para la Conservación en Jardines Botánicos (B.G.C.I.).

En México, se calcula que existen aproximadamente 36 Jardines Botánicos, aunque no es posible dar un número preciso debido a que algunos de estos no cumplen con las características de un verdadero Jardín Botánico. Llegar a establecer el número real es una de las tareas a cumplir por la actual administración de la Asociación Mexicana de Jardines Botánicos, A.C. (Herrera *et al.*, 1993).

1.7 Bancos de semillas y campos de bancos genéticos. Las semillas son las partes de las plantas más apropiadas para su almacenamiento, debido a que contienen el material genético necesario para producir una planta nueva, ocupan poco espacio, algunas especies mantienen su viabilidad hasta por cientos de años y son portadoras de una amplia variabilidad genética. La mayoría de las especies presentan semillas que se pueden desecar hasta alcanzar un contenido de humedad bajo que permitirá su almacenamiento a bajas temperaturas, sin afectar su viabilidad, estas semillas se denominan ortodoxas y entre ellas se encuentran las de los principales cereales cultivados, trigo, maíz, arroz.

Muchas otras plantas, generalmente tropicales, presentan semillas de vida corta (coco, papaya, cacao, caoba) que no se pueden almacenar en un banco de semillas, estas se denominan "recalcitrantes", en su caso se deben

utilizar otros métodos para asegurar su almacenamiento a largo plazo como son los "bancos genéticos en el campo" y los cultivos de tejidos.

En el mundo existen aproximadamente 150 bancos de semillas dedicados especialmente al almacenamiento de material de plantas de importancia comercial, sobre todo de plantas alimenticias. Adicionalmente, muchos jardines botánicos mantienen entre sus colecciones bancos de semillas, preservando principalmente plantas silvestres (Lozoya, 1985).

Los campos de bancos genéticos, son las áreas en las que se mantienen colecciones documentadas de plantas en crecimiento. Proveen el mejor método *ex situ* conocido hasta el presente para conservar árboles y otras plantas con semillas "recalcitrantes". Este tipo de banco genético se encuentra en distintas instituciones, especialmente en el trópico y de forma notable en jardines botánicos, arboreta e instituciones de investigación agrícola y forestal (Lozoya, 1985).

1.8 Cultivo de Tejidos Vegetales. Se denomina también cultivo *in vitro* y se refiere al proceso mediante el cual las plantas pueden ser regeneradas en el laboratorio a través de cantidades pequeñas de material, generalmente en recipientes que contienen medios nutritivos. Esta técnica es una rama de la Biología que basada en la totipotencialidad celular hace posible dividir y cultivar asépticamente *in vitro* sus células, tejidos, órganos, embriones y plántulas en un medio nutritivo bajo condiciones controladas y permite al investigador llegar a dirigir sus respuestas morfogénicas y biosintéticas. En los últimos 15 años las técnicas para cultivar *in vitro* células, tejidos y órganos han tenido un enorme desarrollo que permite en la actualidad aplicarlas prácticamente a todas las especies vegetales, también han permitido un gran avance en el conocimiento básico de la morfogénesis de las plantas y han

encontrado una amplia aplicación para la solución de problemas en las industrias químico-farmacéutica y sobre todo en la agrícola y hortícola donde a nivel comercial se utilizan principalmente en la propagación y recuperación de plantas libres de patógenos (Thorpe, 1978; Robert y Loyola, 1985; Beversdorf, 1990).

La conservación *in vitro* de plantas, tejidos, órganos, células, embriones, puede llegar a ser una alternativa eficiente de la conservación *ex situ*.

Entre los beneficios de éstas técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV), esta la posibilidad de:

1. Conservación de germoplasma *in vitro*. El almacenamiento de germoplasma se puede dividir de acuerdo a la temperatura que se utilice y puede ser de dos tipos. 1) almacenamiento a temperaturas de $27 \pm 3^{\circ}\text{C}$, para el caso de especies de ciclo largo (cactáceas y orquídeas), se puede retrasar el crecimiento utilizando medios con bajas cantidades de nutrimentos, alterando el pH, estrés osmótico, etc. (Schilde-Rentschler *et al.*, 1982). De esta manera se disminuye el crecimiento aunque por periodos cortos. 2) almacenamiento a temperaturas de 4 a 8°C , se aplican las mismas condiciones de cultivo que las citadas en el punto anterior. En el caso de papa (*Solanum tuberosum*), especie de ciclo corto y rápido desarrollo vegetativo.

Lundergan y Janick (1979) citados por Hu y Wang (1983) almacenaron durante un año, a una temperatura de 1 a 4°C en un refrigerador de 0.28 cm^3 , 2000 tubos de ensayo (1 plántula/tubo) con germoplasma de manzano, este mismo germoplasma, en una huerta tradicional hubiera ocupado aproximadamente 5.7 ha; Hu y Wang (1983) citan que más de 50 diferentes cultivares de fresa se han mantenido hasta por 6 años a 4°C en oscuridad.

El almacenamiento de meristemas o ápices por métodos criogénicos a temperatura de -196°C nitrógeno líquido ha sido aplicado a distintas especies

(Kantha, 1982) (Tabla A), no obstante aunque teóricamente es posible por tiempo indefinido, encontraron un decremento en la viabilidad de meristemos de chícharo después de 6 meses en nitrógeno líquido, por lo que el almacenamiento a largo plazo requiere de más investigación.

2. Micropropagación. Mediante ésta técnica es posible lograr una producción clonal, rápida, masiva y libre de patógenos, existen varias especies de interés económico que han sido regeneradas por este método (Murashige, 1974; Beversdorf, 1990) (Tabla B).

Martin (1985) cita que a partir de una sola yema de rosa subdividida cada mes en 4 secciones es posible obtener de 200,000 a 400,000 plantas en un año, en tanto que en el mismo período de tiempo empleando métodos tradicionales se logran 30-50 plantas. Por otro lado, si el sistema de cultivo es de células en suspensión, donde cada una de éstas puede ser teóricamente inducida a formar un embrión, de esta manera el número de plantas que potencialmente se pueden regenerar de un solo frasco de cultivo, se eleva a millones.

Los procesos de regeneración de plantas pueden seguir dos vías: organogénesis o formación de órganos (yemas, raíces) o de embriogénesis somática con la formación de embriones adventicios. Estos procesos pueden ocurrir de manera directa a partir del explante o bien a través de la formación inicial de callo y una posterior diferenciación (George y Sherrington, 1984).

3. Aplicación de las técnicas *in vitro* en especies amenazadas. Para plantas que no forman semillas fácilmente o son muy escasas en la naturaleza la técnica de cultivo *in vitro* resulta muy valiosa. Existen algunos grupos de plantas como las orquídeas y las cactáceas las cuales presentan un riesgo muy elevado de extinción ocasionado por la alteración de su habitat, entre otras actividades del

hombre (Tabla C). Según Toledo (1988), en el grupo de las orquídeas se encuentra un alto grado de endemismos sobre todo en zonas tropicales. Debido a los riesgos que amenazan a este grupo, la familia completa ha sido considerada en el Apéndice 2 de CITES con el objetivo de tratar de proteger las poblaciones silvestres.

Entre las especies más amenazadas de extinción en la naturaleza se encuentran las orquídeas y en nuestro país tienen una gran diversidad (Toledo, 1988). Una de ellas es *Oncidium stramineum* Batem. ex Lindl., que ha sido considerada en serio peligro de desaparecer y se ubica como amenazada de acuerdo a las listas de Sedesol (1994).

1.9 Características generales de la familia Orchidaceae

Las orquídeas, abarcan a nivel mundial más de 700 géneros y 20-25 mil especies (Dressler, 1981). Para México se tienen reportados al menos 144 géneros con 918 especies descritas de las cuales 35 % son endémicas (Soto, 1988).

Las orquídeas son herbáceas perennes, de hábito epífita, terrestre, litófila, semiacuática, saprófita y raramente subterráneo, (restringidas a Australia), son cosmopolitas, crecen en casi todas las latitudes y altitudes, desde el norte de Suecia y Alaska hasta la Tierra del Fuego (América) y la isla Macquarie (Asia), aunque por lo general presentan mayor diversidad en los ambientes tropicales y subtropicales (Dressler, 1981).

Tienen un tipo de crecimiento vegetativo que puede ser simpodial (presente en orquídeas terrestres y algunas epífitas) o monopodial (presente en la mayoría de las epífitas) (Correll, 1950).

Las raíces son cilíndricas, carnosas y tuberosas, muchas especies poseen rizomas de los cuales se originan raíces adventicias con un desarrollo especial de la

epidermis, llamado velamen, formado de varias capas de células muertas, que le permiten a la planta captar y retener agua y nutrientes; el origen de este tejido se relaciona con la simbiosis que establecen con hongos. Muchas epífitas de hábito simpodial forman pseudobulbos que corresponden a engrosamientos de los tallos y presentan varios entrenudos, funcionan como reservorios de agua y nutrientes, poseen diferente forma: globosa, pliriforme o 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 simples y varían de forma, pueden aparecer como una lámina angosta o ancha, pueden ser filiformes y hasta orbiculares, membranosas o coriáceas e incluso también pueden almacenar agua (Dressler, 1981).

Los sépalos (3) están generalmente coloreados al igual que los pétalos y pueden estar libres o más o menos unidos o formando un tubo. El sépalo dorsal difiere generalmente en la forma de los laterales, los cuales son más o menos oblicuos y pueden estar libres uno del otro o adheridos frecuentemente por la base. De los tres pétalos, dos son semejantes morfológicamente y de color entre sí y el tercero llamado labelo está modificado, su posición inferior corresponde al giro del pedicelo o de éste y el ovario (resupinación) (Correll, 1950). El labelo generalmente difiere en forma, tamaño y coloración de los otros pétalos, la superficie interna generalmente está adornada con papilas o lamelas y la base puede ser pequeña o muy amplia formando un nectario. La columna representa la estructura central de la flor y es la unión del pistilo y el estilo. En muchas especies un lóbulo estigmático modificado llamado rostelo, se proyecta sobre la superficie estigmática que permite adherir los polinios a los insectos. La antera puede estar dividida y contener de 2,4,6 y 8 polinios y se

ubica en una cavidad llamada clinandrio. Tienen ovario ínfero con 1-3 divisiones que puede ser inconspicuo o notorio.

La polinización de las flores requiere de la participación de determinados insectos tales como: abejas, moscas, mariposas y escarabajos; así como de colibríes, los cuales son atraídos por atributos estéticos de las orquídeas expresadas en flores de formas y texturas caprichosas, vistosos colores y de atractivos o repugnantes olores.

Entre las características más notables de las orquídeas está el tamaño y estructura de sus semillas. Pesan entre 0.3 y 14 (μg), miden de 0.25 a 1.2 mm de largo y de 0.27 a 0.9 mm de ancho, la semilla contiene un pequeño embrión esférico o piriforme dentro de una testa membranosa, frecuentemente transparente o bien pigmentada. La gran mayoría de las especies tienen embriones relativamente indiferenciados, sin cotiledones, ni endospermo, lo cual se considera una característica de grupos avanzados evolutivamente. Un pequeño grupo de especies poseen embriones con un cotiledón rudimentario, entre estas se encuentran: Encyclia vitellina y Sobralia macrantha. Se han reportado semillas diembriónicas y poliembriónicas (Arditti, 1967). En el cuerpo del embrión es posible distinguir dos regiones, la posterior o chalazal formada de células grandes, vacuoladas, en la cual aún en semillas maduras es posible ver adherido el suspensor. En la región anterior o micropilar las células son isodiamétricas, pequeñas y de denso citoplasma granular, es en esta zona donde se encuentra el meristemo apical del brote (Arditti, 1967 y 1992).

El número de semillas producido por cápsula varía con el género y la especie; fluctúan de 1,300 a 4,000,000 por cápsula, de 5,000-6,000 en géneros como Cephalanthera; de 2-3 millones en Cycnoches y Cattleya (Rão, 1977); no obstante, Arditti (1967) señaló que el rango es de 1,300 hasta 5,000,000; Chávez (1980) reportó para frutos de Bletia urbana entre 92,625 y 117,200 semillas.

Las orquídeas tienen complejas formas de vida y reproducción, dependen en la naturaleza de simbiosis con hongos para la germinación de sus semillas y el desarrollo de las poblaciones de plántulas.

1.9.1 Problemas de conservación en orquídeas

Por siglos muchas de las especies mexicanas de orquídeas, han sido arrancadas por miles de sus hábitats, debido a que han sido muy buscadas por lo atractivo de su flor, su valor ornamental y su enorme variedad. La falta de conocimientos para reproducirlas, hizo que los colectores, sin ninguna otra motivación que la máxima ganancia financiera, colectaran en forma desmedida millones de plantas y destruyeran las plantas que ya no pudieron llevar consigo para así evitarse competidores y elevar sus precios. Esta censurable actitud lucrativa e ilegal aún es común y lamentablemente continuará en tanto aficionados coleccionistas y gente sin una conciencia ecológica, traten de adquirir plantas extraídas directamente de la naturaleza por cualquier medio y a cualquier precio, adquiriéndolas muchas veces con los habitantes de las zonas en donde crecen estas plantas, provocando así la alteración del ambiente y la extinción de las mismas.

Esta situación por desgracia es muy común en México no obstante que las especies animales y vegetales están sujetas a un régimen de preservación, restauración y protección ordenada por la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección del Ambiente (Sedesol, 1994), además de las disposiciones de C.I.T.E.S., de la cual nuestro país ya es miembro a partir de 1991 (Franco y Cuellar, 1994).

I.10 La Clasificación de *Oncidium stramineum* Batem. ex Lindl. según Dressler, 1981 es:

Familia: Orchidaceae
Subfamilia: Vandoideae
Tribu: Cymbldieae
Subtribu: Oncidlinae
Género: Oncidium
Especie: O. stramineum

I.11 Descripción botánica y distribución de *Oncidium stramineum*

La descripción botánica de *Oncidium stramineum* Batem. ex Lindl. de acuerdo con Jiménez (1990), es la siguiente: Hierba epífita, de 15-25 cm de alto sin la inflorescencia. Raíces carnosas de 2 a 5 mm de grosor. Pseudobulbos agregados, subcilíndricos muy reducidos, unifoliados, de 8-13 x 5-7 mm, cubiertos por 4 vainas triangulares acuminadas, escarioso-papiráceas. Hoja elíptica a obovado-elíptica, aguda, coriáceo-suculenta, verde o verde-rojiza con puntos rojos, de 11-20 x 3-5 cm. Inflorescencia basal, paniculada (con 2-3 ramas sencillas y cortas) o en ocasiones racemosa, erecto-arqueada, densa, de 15-30 cm de largo, con 30-50 flores; pedúnculo provisto de brácteas triangulares, escariosas, papiráceas, agudas, de 5-10 x 4-7 mm. Brácteas florales angostamente triangulares, agudas, herbáceo-papiráceas, de 2-5 x 2-3.5 mm. Flores vistosas, carnosas, de ca. 15 mm de diámetro; sépalos y pétalos blanco crema o marfil con una mancha amarilla en la base, labelo con los lóbulos laterales amarillos con puntos rojos y lóbulo medio blanco con puntos rojos en la base (Fig. 3). Sépalo dorsal ligeramente reflexo, cortamente unguiculado, obovado a suborbicular, obtuso, cóncavo, de 8-9 x 6-7 mm. Sépalos laterales

ligeramente reflexos, unguiculados, obovados a elípticos, obtusos, ligeramente cóncavos de 8.5-10 x 5-6 mm. Pétalos extendidos, sésiles, oblongo-ovados, obtusos, márgenes sinuosos y ligeramente ondulados, de 7-8 x 5-6 mm. Labelo trilobado, esencialmente plano, de 8-10 mm de largo y 7-10 mm de ancho entre los lóbulos laterales; lóbulos laterales oblongos, algo retrorsos, con márgenes revolutos, frecuentemente incurvados, con los ápices dirigidos hacia la base del labelo, de 2.7-3.5 x 1.4-2.7 mm istmo breve, angosto, de 2 mm de ancho; lóbulo medio reniforme, emarginado, de 3.5-4 x 6-8 mm. Callo extendiéndose cerca de la mitad del labelo, amarillo con puntos rojos, formado por 4 tubérculos dos basales truncados y dos distales lateralmente apianados, redondeados; entre éstos últimos hay en ocasiones una quilla longitudinal. Columna gruesa, corta, de ca. 5 mm de largo, blanca con manchas rojas hacia el ápice, alada, con tábula infraestigmática prominente, redondeada, subcuadrada, blanca, brillante; alas oblicuamente triangulares, descendentes, gruesas carnosas, blancas con manchas y puntos rojos. Antera oblonga, bilocular, blanca, de ca. 2.5 x 1.8 mm. Polinario con 2 polinios oblongo-obovados, dorsiventralmente comprimidos; estípite laminar, en forma de casco de caballo; viscidio triangular. Rostelo muy corto, laminar, redondeado. Estigma obovado o subtriangular, plano, brillante, blanco con venas rojas. Cápsula no vista (Figs. 3 y 4)

La distribución geográfica de *Oncidium stramineum*, abarca la región de Zacuapam en el centro del Estado de Veracruz, México. Es una especie endémica de hábito epífita que generalmente se localiza en cañadas, a los lados de corrientes de agua, en bosques tropicales subcaducifolios y bosques cálidos, con una altitud de 600 a 1000 metros sobre el nivel del mar. Su época

de floración es de marzo a mayo. Se le conoce con el nombre de "oreja de mula" (por tener hasta dos hojas en un pseudobulbo), (Jiménez, 1990) (Fig. 17).

1.12 Importancia Económica de *Oncidium stramineum*

Tradicionalmente es considerada ornamental, por lo cual ha sido colectada para un comercio ilegal durante largo tiempo. No se tiene información sobre la cantidad de plantas que se colectan ni el valor monetario que alcanzan (Soto y Hagsater, 1990).

Esta atractiva planta puede tener un valor potencial en cruzas para el desarrollo de nuevos híbridos. Su propagación controlada puede ser la base de un comercio legal rentable (Soto y Hagsater, 1990).

II. ANTECEDENTES

II.1 Propagación de *Oncidium stramineum*

Las maneras de propagar a esta especie pueden ser:

a) Propagación por semillas: Estas pueden sembrarse en la base de la planta madre y de otras plantas de la misma especie donde probablemente serán cubiertos los requerimientos de microhabitat incluyendo la asociación con hongos micorrízicos.

b) Propagación por separación de pseudobulbos: Se utilizan pseudobulbos jóvenes ya enraizados que pueden separarse de la planta madre y establecerse en corteza de abeto, bajo luz natural o lámparas fluorescentes.

c) Propagación por cultivo de tejidos; la germinación *in vitro* de sus semillas en un alto porcentaje fué reportada por Martínez Palacios, 1991.

El empleo de ápices de tallo ha resultado un método eficiente de regeneración *in vitro* de orquídeas (Arditti, 1977).

II.1.1 Características de cultivo

Tradicionalmente se puede cultivar *Oncidium stramineum*, tomando en cuenta las siguientes características.

LUZ. Se recomienda un sitio asoleado con sombra moderada

TEMPERATURA. En época de primavera requiere de una temperatura óptima de 24°C, en verano de 18 a 20°C, en otoño de 15°C y en invierno de 16°C.

SUSTRATO. Se sugiere usar corteza de abeto y musgo para conservar la humedad.

RIEGO. Se recomienda 1-2 veces al mes durante noviembre a abril; 1-2 veces por semana durante los meses de mayo a octubre.

FERTILIZACION. En primavera e invierno, se requiere principalmente de Nitrógeno, Fósforo y Potasio; de Nitrato de calcio, Sulfato de amonio, Fosfato de potasio mono- y dibásico y Sulfato de hierro.

ENFERMEDADES Y PLAGAS. Bacterias.- Ocasionalmente ocasionan una pudrición suave en el ápice de las hojas como una mancha verde, pequeña, llena de agua. Virus.- Causante de mosaico que se observa como manchas que corresponden a tejido muerto (necrosis), asimismo otros virus ocasionan clorosis y otros alteran el color de la flor (Jensen, 1959).

Plagas.- Brevipalpus oncidii, ácaro que ataca a los géneros Oncidium y Odontoglossum (Pritchard, 1959).

II.2 Germinación asimbiótica de semillas de orquídeas

Como resultado de las múltiples interrelaciones que mantienen las orquídeas con otros organismos, son particularmente sensibles a todos los cambios que ocurren en su medio ambiente.

No obstante el alto número de semillas que producen, debido a su requerimiento fungal particular, en la naturaleza germinan menos del 5% (Arditti, 1966).

En el pasado no se contaba con un método para cultivar orquídeas por semilla y llegaron a ser consideradas estériles, sin embargo, Bernard 1899, (Knudson, 1922), estableció un método simbiótico para poder lograr su germinación; éste se basaba en infectar las semillas con hongos aislados de la base de las plantas madres, sin embargo según lo reportado por este investigador, de 15000 intentos solamente logró la germinación en unos cuantos cientos. En 1916, Knudson demostró que los azúcares resultaban muy favorables en la nutrición orgánica de las plantas y sugirió que la germinación de las semillas de orquídea podría ser estimulada con este factor, que posiblemente en la naturaleza le

brindaban los hongos a las plantas de orquídeas. Fué en 1922 cuando dispó esta duda y logró por primera vez la germinación asimbiótica, con semillas de un híbrido de *Laelia* X *Cattleya* con la utilización de sacarosa. Desde entonces el método desarrollado por Knudson con base en las investigaciones de Bernard ha tenido una amplia aplicación y estableció las bases para la industria productora de orquídeas. Se considera que Bernard fué el primero en plantear la posibilidad de que la infección fungal era un requisito para iniciar y promover la germinación de semillas de orquídeas, así también fué el primero en germinar semillas de orquídeas en una solución de sacarosa mezclada con una decocción de polvo de tubérculo (salep) (Bernard, 1909). Se estima que entre 1893 y 1974 se produjeron 106,410 híbridos de orquídeas en diferentes partes del mundo y un 80-85% de éstos fueron obtenidos con base en el cultivo asimbiótico de las semillas (Rao, 1977).

Oncidium stramineum Batem. ex Lindl., fue cultivada a través de la germinación de sus semillas (Martínez, 1991), no obstante, en un futuro inmediato será aún más crítica la falta de estructuras de este tipo, por lo que los tejidos somáticos, presentes en las plantas, jugarán un papel cada vez más importante y activo para tratar de micropropagar especies muy escasas en la naturaleza. Llevar a cabo la germinación asimbiótica de semillas, requiere de la disponibilidad de plantas en floración y la espera del desarrollo de los frutos. Por ello, ante esta situación que se traduce en serias limitantes respecto al tipo de estructuras para la propagación, ha resultado necesario intentar el cultivo de tejidos somáticos más disponibles y con la ventaja de que pueden ser más estables genéticamente.

II.3 Propagación clonal y masiva *in vitro*.

El descubrimiento, hace unos 30 años, de que las orquídeas podían ser propagadas asexualmente por cultivo de sus tejidos meristemáticos (Morel, 1960; 1964a,b), ha conducido a un enorme incremento en la producción de estas plantas, la mayoría híbridos artificiales para cubrir la demanda comercial. Fué en el año de 1960 cuando se inició la historia de la propagación clonal por cultivo de tejidos en plantas superiores, con los estudios realizados por Morel (1974), al utilizar por primera vez tejidos meristemáticos de una orquídea del género Cymbidium. De esta forma llegó a establecer un sistema de propagación masiva con la formación de masas celulares que denominó cuerpos en forma de protocormos (Protocorm Like Bodies, PLB's), donde cada protocormo asexual, al subcultivarse en medios frescos inductores, presentaba la capacidad de inducir nuevos PLB's por tiempo indefinido, o de regenerar una planta por protocormo en el medio basal adecuado. La utilización de tejidos meristemáticos de ésta orquídea, también permitió la obtención de plantas libres de virus a partir de plantas contaminadas (Morel, 1974; George y Sherrington, 1984).

La potencialidad de la micropropagación asexual en orquídeas es analizada por Morel (1974) para el género Cymbidium, tomando en cuenta el establecimiento previo de PLB's originado de la utilización de diversos explantes somáticos, reporta que a partir de un protocormo asexual que se seccione en cuatro partes, cada fragmento genera en promedio 8 protocormos, es posible obtener más de un billón de plantas en sólo 9 meses de cultivo. Arditti (1977) utilizando este mismo sistema indica, que a partir de una yema de una planta de Cymbidium se pueden obtener 4 millones de plantas al año.

Las investigaciones realizadas por Knudson (1922 y 1946) y Morel (1960), han servido de base para explotar con buen éxito la regeneración de plantas de

orquídeas a partir de otros explantes como protocormos, ápices de raíz, ápices de tallo, secciones nodales, ápices y bases de hojas, partes florales, meristemas, entre otros (Arditti, 1977; Rao, 1977 y George y Sherrington, 1984)

II.4 Cultivo *in vitro* de ápices

Desde la multiplicación clonal de Cymbidium a partir de ápices de tallos jóvenes, hecha por Morel (1960) muchas otras orquídeas en más de 30 géneros se han propagado en esta forma (Murashige, 1974; Morel, 1974; Arditti, 1977; Sagawa y Kunisaki, 1982; George y Sherrington, 1984, citados por Stewart, 1989). A partir de ápices y meristemas apicales de tallo de Oncidium papillo respectivamente se regeneraron PLB's y plántulas *in vitro* (George y Sherrington, 1984).

Entre las respuestas logradas por el cultivo de tejidos de ápices y meristemas se encuentran:

- 1.- La producción de masas de tejido morfológicamente idénticas a los protocormos,
- 2.- Tales protocormos adventicios desarrollan raíces y brotes y generalmente crean más estructuras en forma de protocormos, PLB's.
- 3.- El número de protocormos obtenidos de un sólo meristemo puede aumentarse al seccionarse y subcultivarse a medio nutritivo fresco, y este proceso puede repetirse o bien permitir que se regeneren las plántulas individuales según Morel (1964), citado por Stewart (1989).

Asimismo, se encontró que si los meristemas o yemas son cultivados en medio líquido, y particularmente si se mantienen en constante agitación es posible incrementar el número de PLB's de manera considerable (Stewart, 1989). Morel (1964) estimó que con la división frecuente de los PLB's durante un año, podría generar hasta 4 millones de plántulas.

El empleo de yemas terminales y axilares a partir de ápices se han utilizado frecuentemente demostrando que este tipo de explante es confiable para el logro de respuestas morfogénicas (Sagawa, 1961; Morel, 1963; 1964 a y b; 1970; 1971; 1974; Vacherot, 1966; Sagawa et al., 1966; Marston y Voraurai, 1967; Rehnert y Mohr, 1967; Sagawa y Shoji, 1967; Champagnat y Morel, 1969; Lindemann et al., 1970; Kim et al., 1970; Vajrabhaya y Vajrabhaya, 1970; Tse et al., 1971; Kunisaki et al., 1972; Fonnesbech, 1972; Teo et al., 1973; Intuwong y Sagawa, 1974; Sagawa y Kunisaki, 1982).

El cultivo de tejidos vegetales ha sido utilizado en una gran cantidad de especies, generalmente de interés económico en el área hortícola y agrícola (Tabla B). Esta técnica será una herramienta muy versátil y práctica o quizá la única opción en la propagación de especies como *Oncidium stramineum* Batem. ex. Lindl., que se extinguen en la naturaleza (Figs. 15 y 16).

III. OBJETIVOS

Objetivo General:

Establecer las condiciones experimentales para lograr la regeneración *in vitro* a partir de ápices de tallo de plántulas de *Oncidium stramineum* Batem. ex Lindl.

Objetivos particulares:

- 1.- Describir los efectos de los sistemas de cultivo líquido y sólido en la formación de PLB's.
- 2.- Evaluar el efecto de los diferentes reguladores del crecimiento en el cultivo *in vitro* de ápices.
- 3.- Analizar y describir la respuesta morfogénica de los ápices durante su cultivo *in vitro* hasta la regeneración a plántulas.

HIPOTESIS DE TRABAJO

Se ha demostrado que en especies de orquídeas y otros grupos de plantas, la morfogénesis de varios cultivos puede ser afectada por las condiciones físicas del medio y por distintas concentraciones hormonales, entonces cultivos *in vitro* de ápices de *Oncidium stramineum* en medio líquido y sólido en presencia de K y 2,4-D reflejarán la influencia de estos factores en su desarrollo morfogénico.

IV. MATERIALES Y METODOS

Los ápices de tallo utilizados en esta investigación, se obtuvieron a partir de plántulas de orquídeas *in vitro* de la especie *Oncidium stramineum* Batem. ex Lindl., con una edad de 8-10 meses y tamaños de 1-3 cm de longitud (Fig. 5), las cuales fueron generadas de la germinación asimbiótica de sus semillas (Martínez, 1991) en medio nutritivo Knudson "C" (KC) (Knudson, 1946) (Fig. 2) (Apéndice 2).

El medio de cultivo empleado en el presente estudio fue el denominado KC-E, reportado por Martínez (1991), que es el resultado de enriquecer el medio nutritivo Knudson "C" (KC), con micronutrientes minerales y vitaminas del medio B5 (Gamborg *et al.*, 1968), y la adición de sacarosa al 2 % (Apéndice 1).

Se ensayaron 2 condiciones físicas de los medios de cultivo, el medio líquido y el sólido, éste último con Bacto agar 8 g/l. Para estimular la respuesta morfogénica, se adicionaron al medio nutritivo fitorreguladores del crecimiento; Auxina: Ácido 2,4- Diclorofenoxiacético (2,4-D) y Citocinina: 6-furfurilaminopurina (Kinetina, K). Realizando 12 combinaciones hormonales con las siguientes concentraciones K: 0, 1, 2 y 3 mg/l y 2,4-D: 0, 1 y 2 mg/l (Tablas 1 y 2).

Previo a la preparación del medio KC-E, se realizaron soluciones concentradas de las sales minerales (soluciones stocks) (Apéndice 1).

El pesaje y adición de las sales de calcio y hierro se realizó al momento de preparar el medio nutritivo, debido a que sus soluciones concentradas al ser almacenadas se precipitan.

En un vaso de precipitados de 2 litros se agregó un litro de agua destilada y se colocó sobre una parrilla de agitación, para la disolución de los componentes, se mezclaron las sales minerales y los compuestos orgánicos según el orden a)

macronutrientes, b) fuente de calcio, c) fuente de hierro, d) micronutrientes, e) inositol, f) vitaminas, g) sacarosa y h) fitohormonas del crecimiento (Apéndice 1) Posteriormente se aforó el medio con agua destilada hasta un volumen fácilmente divisible entre los distintos tratamientos, entonces se midió el pH y se ajustó a 5 con KOH y/o HCl 0.1, 0.5 ó 1N. A los medios de cultivo que serían sólidos, después de medir el pH, se adicionó Bacto agar (8 g/l), agitando constantemente y calentando para disolverlo (hasta inicio de ebullición).

Se utilizaron frascos de boca ancha de 125 ml para vaciar en ellos 15 ml del medio de cultivo KC-E ya preparado, tanto líquido como sólido, haciendo un total de 96 frascos, los cuales en forma conjunta con otros frascos con agua destilada bien tapados y cajas de petri, se esterilizaron en un autoclave vertical a 1.4 kg/cm², (20 Lb/pulg²), 126°C durante 15 minutos.

La siembra de ápices de tallo, se llevó a cabo en condiciones de asepsia, en una campana de flujo laminar horizontal, la cual se hizo funcionar al menos 20 minutos antes de iniciar toda labor de sembrado, se procedió a desinfectar con alcohol etílico industrial al 96 % toda la superficie de trabajo, al igual que el material ya esterilizado (medios de cultivo, frascos con agua destilada, y cajas de petri), así como el microscopio estereoscópico e instrumental como espátulas, bisturíes, pinzas y agujas de disección, los cuales se colocaron dentro de un frasco con etanol al 96 %. Todo el material se limpió cuidadosamente conforme se colocaban dentro de la campana, nuestras manos y antebrazos también se desinfectaron con alcohol, antes de iniciar cualquier labor dentro de la campana de flujo laminar.

Con la ayuda de un microscopio estereoscópico, se disectaron asépticamente ápices de 1-3 mm longitud (un ápice por planta), el aislamiento se hizo sobre una caja de petri con un bisturí y pinzas de disección, se removieron hojas y raíces de la planta hasta obtener los ápices de tallo (Fig. 6), los cuales fueron

sembrados en medios KC-E líquidos y sólidos, colocando 5 ápices por frasco y 4 (frascos) repeticiones, esto es 20 ápices por tratamiento, con 240 ápices en doce combinaciones y un total de 480 ápices en los dos medios de cultivo.

Durante las operaciones de disección y subcultivos, el instrumental fue introducido periódicamente en etanol y flameado en un mechero Bunsen, seguido de su inmersión en agua destilada esterilizada para enfriarlo (pasos que se deben seguir para reducir los riesgos de contaminación microbiana) (Debergh y Read, 1991).

Para destapar los frascos con medio esterilizado y poder sembrar los ápices en ellos, se flameó toda la superficie de unión entre el frasco y la tapa, enseguida se destapó y se flameó en la parte interior de la tapa y la boca del frasco, posteriormente se introdujeron los ápices a cultivar, se cerró el frasco y fue sellado con PVC (ega-pack) y por último los frascos se rotularon con marcador indeleble registrando el nombre de la especie, medio de cultivo y fecha de siembra.

Los frascos, se incubaron en una cámara de cultivo a una temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo de 16 h luz y una intensidad luminosa de 300-500 lux.

Los cultivos líquidos se mantuvieron en agitación continua a 85 rpm sobre una plataforma de agitación orbital horizontal.

Se realizaron subcultivos a medio fresco a las 8, 16 y 21 semanas. Los dos primeros subcultivos se hicieron a medios que no cambiaron su composición, en tanto que a las 21 semanas, todos los cultivos líquidos se pasaron a medio sólido fresco sin reguladores de crecimiento (Fig. 1).

Tanto para los medios líquidos como los sólidos, se realizaron conteos de las estructuras regeneradas en 3 tiempos de incubación, a las 4, 8 y 16 semanas. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico se cuantificó el número de

PLB's formados por ápice y por tratamiento (Tablas 1 y 2), estos resultados se graficaron (Gráficas 1 y 2)

Para el caso de los subcultivos de medio líquido a sólido, se registró el incremento del número de brotes después de 8 semanas de pasarlos a medio sólido (Gráfica 3).

V. RESULTADOS

Dentro de la primera y segunda semana en cultivo los explantes crecieron, alcanzaron 2-4 mm de talla total y se observaron verdes, con un aumento de tamaño en todos los tratamientos.

Las primeras respuestas morfogenéticas se manifestaron después de tres semanas de iniciados los cultivos tanto en medio líquido como en sólido.

Al concluir las primeras 4 semanas, los explantes en algunos tratamientos no habían presentado respuestas morfogenéticas, esto ocurrió en aquellos donde las concentraciones de auxina fueron mayores que los de la citocinina (K/2,4-D mg/l), 0/1, 0/2 y 1/2, no obstante, al cabo de las 16 semanas de cultivo en todos los tratamientos ocurrió la formación de plántulas. Esta falta de respuesta inicial se observó sólo en los medios líquidos, pues en los sólidos, en todos los tratamientos a las 4 semanas de incubación se encontraron pequeños brotes.

Esta respuesta morfogenética se caracterizó, por el desarrollo de los explantes en masas proliferativas de contorno irregular, tendiente a una forma esférica con nódulos. Posteriormente se desarrollaron en pequeños primordios de brotes estructuralmente semejantes a (PLB's) o protocormos tipo cattleya (Figs. 7 y 8).

V.1 Medio Líquido

4 semanas de cultivo

Dentro de las primeras 4 semanas de incubación, los explantes manifestaron una respuesta temprana a las condiciones de cultivo *in vitro*, que puede considerarse como homogénea en cuanto a su crecimiento, presentaron un tamaño aproximado de 3-5 mm de longitud y fueron de color verde intenso. Respecto a su desarrollo, en la mayoría de los tratamientos, de la superficie de

los explantes sobresalían pequeños brotes semejantes a PLB's, los cuales se formaron en cantidades diferentes asociadas a los distintos tratamientos hormonales ensayados (Figs. 9 y 11)

El mayor número de PLB's (19) se formó con sólo K 1mg/l, en ausencia de la auxina, el segundo mejor tratamiento en términos del número de PLB's formados fué el de K 2 mg/l y 2,4-D 1mg/l, con 16 brotes.

Por otro lado, las combinaciones en que se lograron las menores cantidades de brotes fueron, 6 brotes en 0/1 y con 7 brotes en 1/1 y 2/2 (Tabla 2).

Un promedio del número de brotes en todas las combinaciones fué de 10.50 y por explante fué de 0.71.

En general a las 4 semanas de cultivo los brotes se observaron como característicos protocormos verdes.

8 semanas de cultivo.

Los explantes habían perdido toda organización original y se convirtieron en masas semiesféricas de superficie irregular, de 5-7 mm con un diámetro promedio de 6 mm. Algunos presentaron signos de necrosis y el medio de cultivo cambió a una coloración amarillenta.

El mayor número de PLB's (36) se formó con sólo K 1mg/l, sin auxina, el segundo mejor tratamiento en cuanto al número de brotes formados fue el de K 2mg/l y 2,4-D 1mg/l con 34 PLB's. Por otro lado, las combinaciones hormonales en que se lograron las menores cantidades de brotes fueron, con 13 brotes en 2/2 y 14 brotes en 0/1 y 3/0 (Tabla 2).

Un promedio del número de brotes en todas las combinaciones fué de 21.75 y por explante fué de 1.56.

16 semanas de cultivo

En este tiempo de incubación fué alto el número de estructuras 79 y 73 PLB's (en los 2 mejores tratamientos arriba citados) con tamaños aproximadamente de 9-11 mm, el medio de cultivo había adquirido un color café oscuro de aspecto turbio.

El mayor número de PLB's (79) se formó con sólo K 1mg/l, en ausencia de la auxina, el segundo mejor tratamiento en términos del número de brotes formados fue el de K 2mg/l y 2,4-D 1 mg/l con 73 brotes.

Por otro lado, las combinaciones en que se lograron las menores cantidades de brotes fueron, con 32 brotes 2/2 y con 34 brotes 0/1 (Tabla 2).

Un promedio del número de brotes en todas las combinaciones fué de 47.83 y por explante fué de 3.75.

V.2 Medio Sólido

4 semanas de cultivo

Al igual que en medio líquido las respuestas de desarrollo en los cultivos se iniciaron dentro de las primeras cuatro semanas. La mayoría de los explantes presentaron un ensanchamiento en todo el cuerpo, con formación de PLB's de más de 1 mm de longitud en la parte media y periferia, presentaban una coloración verde claro. Los explantes además de un aspecto vigoroso adquirieron una forma irregular de crecimiento (Fig. 10).

El mayor número de regenerantes (23) se formó con sólo K 1 mg/l, en ausencia de la auxina, el segundo mejor tratamiento en términos del número de PLB's formados fue el de K 2mg/l y 2,4-D 1mg/l con 15 brotes.

Por otro lado, las combinaciones en donde se lograron las menores cantidades de brotes fueron, con 5 brotes 2/0 y con 6 brotes 0/1 (Tabla 1).

Un promedio del número de PLB's en todas las combinaciones fué de 10 y por explante fué de 0.78.

8 semanas de cultivo.

El desarrollo de más PLB's mejor definidos fue notorio, pero también algunas partes del explante empezaron a necrosarse, mientras otras presentaron una coloración verde intenso y un aspecto vigoroso. El tamaño de los nuevos brotes era aproximadamente de 5-7 mm de longitud.

El mayor número de PLB's (42) se formó con sólo K 1mg/l, en ausencia de la auxina, el segundo mejor tratamiento en cuanto al número de brotes formados fue el de K 2mg/l y 2,4-D 1mg/l con 29 brotes.

Por otro lado, las combinaciones en donde se lograron las menores cantidades de brotes fueron, con 14 brotes 0/1 y 2/0 y con 15 brotes en 3/2 (tabla 1).

Un promedio del número de brotes en todas las combinaciones fué de 20.16 y por explante fué de 1.62.

16 semanas de cultivo

En este tiempo de incubación los explantes tenían un aspecto muy distinto al que presentaron en un inicio, alcanzaron tamaños de 9-11 mm, con un promedio de 10 mm en diámetro. El número de estructuras regeneradas se incrementó de tal forma que la superficie del medio en el frasco era pequeña para esa masa.

El mayor número de PLB's (89) por tratamiento se formó con sólo K 1 mg/l, en ausencia de la auxina, el segundo mejor tratamiento en términos del número de brotes formados fue K 2mg/l y 2,4-D 1mg/l con 57 brotes.

Por otro lado, las combinaciones en que se lograron las menores cantidades de PLB's fueron, con 18 brotes 2/0 y con 21 brotes 0/1 (Tabla 1).

Un promedio del número de brotes en todas las combinaciones fué de 37.08 y por explante fué de 3.34.

V.3 Subcultivo de medio líquido a sólido.

A las 21 semanas, todas las masas de PLB's de los cultivos en medio líquido, fueron transferidas a medio sólido, KC-E sin hormonas (Figs. 1, 9 y 12).

Estos cúmulos tenían en promedio un diámetro de 13 mm, formados de varios nódulos, con PLB's cortos y alargados con aspecto de pequeñas plántulas, la apariencia de cada PLB era normal, eran numerosos, unidos en su base, pero de talla reducida y de color verde amarillento.

Los medios de cultivo líquidos habían adquirido un color oscuro y ello redujo el paso de la luz al interior de los frascos.

Al subcultivar las masas de PLB's a medio sólido, se disgregaron en forma espontánea; la separación ocurrió siempre de las bases de las estructuras regenerantes sin necesidad de realizar corte alguno.

Fué notable que antes de concluir la primera semana en medio sólido; las plántulas y los PLB's agregados tuvieron un rápido crecimiento y desarrollo, hasta convertirse en pequeñas y numerosas plántulas, los crecimientos nodulares se diferenciaron en más PLB's (Fig. 12).

Comúnmente el rápido crecimiento que experimentaron los protocormos independientes (no agregados) fué la elongación de sus hojas, seguida del desarrollo de una o dos raíces. En forma eventual más PLB's se originaron de la unión tallo-raíz (Fig. 13).

Los agregados de PLB's en medio sólido tuvieron inicialmente una tendencia a crecer y proliferar en nuevos PLB's de una corta altura (1-3 mm) casi homogénea, al manipular los frascos aún con movimientos ligeros, éstos provocaron la disgregación de los cúmulos esféricos.

En otras masas de protocormos, uno o varios brotes crecieron rápidamente y predominaron sobre el resto de los PLB's de menor altura y desarrollo que parecían estar inhibidos.

Los agregados oxidados en medio líquido y aquellos que una vez estando en medio sólido presentaron zonas oscuras, posteriormente se recuperaron y continuaron su crecimiento y desarrollo y llegaron a proliferar, indicando que la necrosis no fué letal.

Al término de uno o dos meses los frascos de cultivo contenían numerosos brotes, comúnmente de una altura homogénea, al realizar subcultivos para disminuir la densidad de población en los frascos, los brotes respondieron con una fase de activo crecimiento. Se observó que bastaba con destapar los frascos (sin retirar brote alguno) y volver a taparlos para que ocurriera esa etapa de notorio crecimiento, las plántulas alcanzaron tamaños de 1-2 cm, con raíces de 3-6 mm de longitud en promedio (Fig. 14).

EL mayor número de PLB's y plántulas (237) se formó de los cultivos que provenían del tratamiento con sólo K 1 mg/l, en ausencia de la auxina, el segundo mejor resultado provino del tratamiento en K 2 mg/l y 2,4-D 1 mg/l con 219 brotes.

Por otro lado, se obtuvieron las menores cantidades de brotes con K 2 mg/l y 2,4-D 2 mg/l con 96 brotes y con K 0 mg/l y 2,4-D 1 mg/l con 102 brotes (Gráfica 3).

El promedio total del número de brotes fué de 143.5 por tratamiento.

VI. DISCUSION

Los ápices de *Oncidium stramineum* presentaron cambios en su morfología y tamaño a las dos semanas. A las cuatro semanas se observaron sobre su superficie estructuras semejantes a protocormos que parecieron surgir de manera directa del explante, es decir, sin mediación de callo. Intuwong y Sagawa (1974) que cultivaron ápices de Dendrobium noble, inicialmente en medio líquido y después los subcultivaron a medio sólido, obtuvieron la formación de PLB's después de dos meses de iniciados los cultivos. Sin dejar de considerar que pudiera haber diferencias a nivel de especie, es posible que sus observaciones no hayan sido detalladas o frecuentes para observar cambios más tempranos, pues en un estudio posterior de los mismos autores (Intuwong y Sagawa, 1975) describieron la formación de PLB's a las cuatro y cinco semanas en medio líquido a 160 rpm a partir de híbridos de Dendrobium.

Arditti (1977), señala que el cultivo de ápices de yemas (1-3 mm longitud) de Cattleya en medio líquido durante 3 semanas favorece su crecimiento y al ser pasados al medio sólido alcanzan un diámetro de 3-6 mm, en 3-6 semanas en que también ocurre la proliferación. Nuestros cultivos de *Oncidium stramineum* coinciden parcialmente con estos resultados pues en medio líquido ocurrió la transformación de los explantes en estructuras semiesféricas antes que en los medios sólidos (Fig. 9). Esto se consideró un efecto físico de la agitación continua en los medios líquidos en los que al cabo de las 16 semanas de cultivo se desarrolló un mayor número de PLB's y plántulas en tanto que en el medio sólido el número fue menor (Tablas 1 y 2 y gráficas 1 y 2).

Kunisaki et al. (1972), observaron que los explantes proliferaron en menos tiempo y en mayor número cuando se colocaron en medio líquido que cuando se sembraron en medio sólido, para ellos el resultado fue: en medio líquido el 33%

de los explantes fueron regenerativos, mientras que esto ocurrió con sólo el 8% de los explantes en medio sólido.

Con base en estas observaciones podemos señalar que en nuestros cultivos, en ambas condiciones físicas ocurrió el proceso de inducción de estructuras regenerantes y posteriormente se presentó el desarrollo de PLB's y plántulas. Sin embargo en medios líquidos ocurrió un retraso o inhibición temporal de la mayoría de éstos (Fig. 11), en tanto que en los medios sólidos en donde los explantes están expuestos a una fase aérea considerable, se facilitó el desarrollo y la maduración de la mayoría de los PLB's en menos tiempo (Fig 10). La inhibición del desarrollo en los medios líquidos se debió posiblemente a la baja concentración de oxígeno y alta concentración de gases como por ejemplo el etileno, que como se sabe, las plantas pueden liberar en altas concentraciones al encontrarse en cierto proceso del desarrollo (germinación, crecimiento de raíces y hojas, abscisión) o bien bajo algún estrés, como puede ser estar inmersos sus tejidos o con alguna lesión, frío, etc. (George y Sherrington, 1984; Yang et al., 1994). El etileno (C₂H₄) se ha significado como un factor que afecta el crecimiento y diferenciación de los tejidos (Tisserat y Murashige, 1977 a y b; Yang et al., 1994), han observado que la ligera anoxia provocada por la inmersión total de protocormos en un medio líquido estático, inhibe el crecimiento de los puntos vegetativos y dirige la morfogénesis hacia la producción de un gran número de protocormos y posteriormente en uno o dos meses la formación de enormes colonias. En tal caso sería posible la orientación de la morfogénesis hacia la proliferación de protocormos y el crecimiento de brotes con hojas en medios simples sin la adición exógena de reguladores de crecimiento.

En los cultivos de *Oncidium stramineum*, fué notable el hecho de que no se formaran plántulas a partir de la zona de contacto del explante con el medio

sólido, esto nos permite suponer que ocurrió el mismo tipo de inhibición observada en el medio líquido. La literatura registra distintos casos en que se ha documentado la inhibición de respuestas morfogénicas provocada por etileno. En *Picea abies* (Wann et al., 1987); *Daucus carota*; *Phoenix dactylifera* (Thomas y Murashige, 1979) y en *Hevea brasiliensis* (Aubolron et al., 1990) se inhibió la embriogénesis somática.

La ruptura de la inhibición del desarrollo y crecimiento de las hojas de los protocormos, por el simple hecho de destapar (airear) los frascos de cultivo, refuerza la idea de que tal retraso fué promovido por alguna (s) sustancia volátil (CO₂, etileno o etanol) que se acumuló en la atmósfera de los cultivos. Plántulas de *Cattleya aurantiaca* provenientes de la germinación asimbiótica de sus semillas produjeron un menor número de hojas, y éstas fueron de talla reducida cuando estuvieron en presencia de ácido 2- cloroetilfosfónico (precursor de etileno) en concentraciones de 5-50 mg/l (Ernst et al., 1992). La reducción de la longitud de las hojas es un conocido efecto del etileno (Abeles, 1973; Saltvelt y Yang, 1987 citados por Ernst et al., 1992), así como la inhibición de la elongación de las plántulas (Eisinger, 1983).

El desarrollo de las plántulas generadas a partir del cultivo de ápices de *Oncidium stramineum* (Figs. 15 y 16), siguió las mismas etapas morfológicas en medios sólidos y líquidos: Los explantes crecieron, se mantuvieron verdes y adquirieron una forma semiesférica; (sin aparente formación de callo). Se formaron estructuras nodulares, numerosas, de las que en su parte apical se diferenció el primordio de la primera hoja con lo cual fueron identificadas como estructuras semejantes a protocormos PLB's que después se elongaron quedando unidos los numerosos brotes de cuya base posteriormente surgieron 1 a 2 raíces generalmente después de su individualización, en la base del tallo se observó el ensanchamiento que correspondió al pseudobulbo.

En términos generales el tiempo en que ocurrió esta respuesta fué de 29 semanas.

El desarrollo descrito coincide con las descripciones, hechas por Arditti (1966) respecto a semillas de Cattleya en germinación; por lo que podemos indicar que la vía de regeneración seguida en los ápices de *Oncidium stramineum*, fué de embriogénesis somática (Ammirato, 1989); y que de acuerdo a Martínez (1991) en sus observaciones sobre la germinación de esta especie, y a nuestras descripciones los protocormos corresponden al tipo Cattleya (Withner, 1975), en los que previo a la aparición de las raíces se forma el brote de las nuevas plántulas (Figs. 7 y 8).

Las razones por las cuales se obtienen mejores resultados y/o una mayor proliferación en medios líquidos agitados no son completamente claras. Es posible que la agitación impida un desarrollo polar, inhibiendo con ello el desarrollo de raíz y/o brote (Scully 1967; Wimber, 1963, 1965). Otras posibilidades son una mejor aireación, aumento de una superficie, e igual distribución o dilución de metabolitos que podrían ser tóxicos. Pero como también la proliferación se ha reportado en gran escala en medio líquido estático (Kako, 1973) puede ser de gran interés ensayar medios agitados y estáticos.

Todo estudio que pretenda (a mediano o largo plazo) llegar a establecer algún método que permita la regeneración y propagación *in vitro* de especies amenazadas deberá considerar la elección y disponibilidad de aquel tipo de explante que con mayor probabilidad pueda generar alguna respuesta morfogénica.

Revisiones extensas sobre la micropropagación de orquídeas como son las de Arditti (1977) y George y Sherrington (1984) establecen que los cultivos derivados de ápices de tallo tienen un alto potencial para la proliferación, pues *in vitro* presentan una tendencia a formar protocormos somáticos (formados

vegetativamente; no derivados de semillas; PLB's) y éstos a su vez pueden generar pronto numerosos protocormos secundarios, especialmente en medio líquido (Sagawa y Shoji, 1967; Scully, 1967; Lindemann et al., 1970; Irawati et al., 1977 citados por George y Sherrington, 1984).

Los cultivos iniciales en medio líquido y después subcultivados a medio sólido fueron los que generaron un mayor número de PLB's (Fig. 12), un hecho que nos permite considerar que se lograron combinar ventajas de los sistemas individuales, líquido y sólido como son:

a) En el medio líquido un mayor número de células se ven involucrados en los procesos de inducción de morfogénesis al encontrarse el explante inmerso y bañado en toda su superficie por el medio nutritivo, en tanto que en el medio sólido se establecen gradientes.

b) En los medios líquidos se logran tasas de crecimiento más rápidas probablemente debido a una mayor y más eficiente toma de ingredientes del medio.

Se ha encontrado que los resultados diferenciales obtenidos en medios sólidos y líquidos pueden ser combinados en forma efectiva para obtener un mejor sistema de micropropagación. Se ha utilizado el cultivo en medios líquidos en agitación, para el cultivo de ápices y así promover su proliferación, para después transferirlos a medio sólido y lograr su desarrollo y crecimiento (George y Sherrington, 1984).

c) La tensión de oxígeno del medio, parece ser un factor importante en determinar una respuesta morfogénica.

En condiciones de anaerobiosis parcial o completa, la actividad de las enzimas que catalizan reacciones reductoras puede aumentar y además disminuir la de las enzimas oxidativas, es posible que pueda decrecer la actividad de la AIA-oxidasa (Kessel y Carr, 1972 citados por George y Sherrington, 1984), y con ello

presentarse un efecto estimulativo de la embriogénesis promovido por bajas concentraciones de oxígeno disuelto, que tendría un efecto similar a aumentar temporalmente el nivel de auxina del medio.

En cultivos en suspensión de células de zanahoria, sólo se encontraron embriones cuando el oxígeno disuelto en el medio se redujo a un nivel crítico.

El crecimiento de los explantes y la proliferación de PLB's en orquídeas es promovido en medios líquidos donde hay un suministro de aire, mientras que el crecimiento del brote se favorece en medios estáticos o sólidos.

Si bien al cabo de las 16 semanas de cultivo se formaron más PLB's en medio líquido (574 PLB's) que en medio sólido (445 PLB's), en éste se logró un mayor desarrollo y se obtuvo el valor más alto de regenerantes (89) en el tratamiento No.4 con K 1 mg/l (Tabla 1), esto es explicable, probablemente por una menor inhibición (concentración) por etileno y una rápida diferenciación en condiciones físicas del medio sólido.

Fué notorio el hecho de que en ambas condiciones físicas los mismos tratamientos hormonales: K 1 mg/l (tratamiento 4) y K 2 mg/l + 2,4-D 1 mg/l (tratamiento 8) resultaron los más efectivos en la inducción y desarrollo de PLB's y plántulas, en ambos existió un balance a favor de la citocinina, de 1 mg/l sobre la concentración de la auxina, lo cual concuerda con lo establecido por Skoog y Miller (1957) acerca de que una concentración mayor de citocinina sobre la auxina promovería la formación de brotes y la situación inversa induciría al desarrollo de raíces.

Sin embargo esto no fué un requisito para tener valores relativamente altos de PLB's como se demuestra por ejemplo en los tratamientos 3, 6 en los que se presenta un balance a favor de la auxina o donde no existe diferencia en las concentraciones (tratamientos 9). Un caso de particular interés fué la formación de PLB's aún en medios sin alguno o sin ambos fitorreguladores lo cual revela

varios aspectos: a) las respuestas morfogénicas no dependieron de la presencia de los reguladores de crecimiento, ello indicó que las células no necesitaran una redeterminación promovida por los fitoreguladores ensayados para adquirir competencia sino que las células ya la tenían y así lo expresaron; b) un mayor número de regenerantes se formó cuando los explantes estuvieron bañados por el medio líquido; c) el medio de cultivo pudo ejercer un efecto osmótico promotor de la regeneración (Wetherell, 1984).

Un hecho bien establecido es que la relación auxina: citocinina es de fundamental importancia en las respuestas morfogénicas y que el balance realmente inductor es el que se establezca endógenamente en los tejidos, además del genotipo y la edad del tejido (Niederwieser y Van Staden, 1992).

VII. CONCLUSIONES

Se demostró que la hipótesis de trabajo planteada bajo las condiciones experimentales ensayadas tuvieron influencia en las respuestas morfogénéticas (PLB's) y el desarrollo de plántulas completas.

La formación de las estructuras regenerantes (PI.B's y plántulas) ocurrió en todos los tratamientos, aún en ausencia de los fitorreguladores K y 2,4-D, cuya presencia tuvo influencia en el número de las estructuras regeneradas.

La formación de PLB's y plántulas ocurrió en los medios de inducción (en presencia de los reguladores de crecimiento) sin necesidad de realizar un subcultivo a medio libre de hormonas.

Las estructuras regeneradas se formaron sin mediación de callo, se iniciaron como pequeños nódulos y se identificaron por su morfología como estructuras semejantes a protocormos (PLB's) tipo cattleya, es decir como embriones somáticos por lo que se puede señalar que se formaron en una embriogénesis somática directa.

El crecimiento y número de PLB's fueron influenciados por la naturaleza física del medio.

- En términos de tiempo de crecimiento el medio sólido resultó mejor
- En términos del número de regenerantes el medio líquido fué mas efectivo.
- La combinación de ambos medios de cultivo resultó el mejor sistema de regeneración y se propone que a mayor escala sería un buen método de propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Batem. ex Lindl.

VIII. FIGURAS

- FIG. 1. Diagrama de flujo para la regeneración *in vitro* de *Oncidium stramineum* Batem. ex Lindl.
- FIG. 2. Diagrama de flujo para la germinación asimbiótica de *Oncidium stramineum* Batem. ex Lindl.
- FIG. 3. Flores de *Oncidium stramineum* Batem. ex Lindl.
- FIG. 4. Ejemplar de herbario, mostrando planta completa de *Oncidium stramineum* (a) inflorescencia (b) fruto.
- FIG. 5. Selección de plántulas de orquídeas *in vitro* con edades de 8-10 meses y tamaños de 1-3 cm de longitud.
- FIG. 6. Apice disectado con un tamaño de 1-3 mm (explant) de plántulas *in vitro*.
- FIG. 7. Desarrollo de PLB's (a) fase nodular (b) protocormo tipo cattleya, observar primordios de hoja.
- FIG. 8. Plántulas aún sin raíces (fase característica de los protocormos tipo cattleya).
- FIG. 9. Desarrollo de ápices en medio líquido (a) formación de nódulos (b) presencia de hojas en los protocormos.
- FIG. 10. Cultivos en medio sólido con menos brotes, pero con un mayor desarrollo que en medio líquido, en el mismo periodo de tiempo.
- FIG. 11. Proliferación masiva de PLB's en medio líquido
- FIG. 12. Formación de brotes en medio sólido sin hormonas, después de haber proliferado en medio líquido (Inducción).
- FIG. 13. Presencia de raíces en el subcultivo de medio líquido a sólido (a) emergencia de la raíz
- FIG. 14. Elongación de las raíces en donde se observan dos zonas de diferenciación (a) área sin clorofila y (b) área con clorofila.
- FIGS. 15 y 16. Fase de aclimatación en el invernadero de plantas regeneradas por la técnica de cultivo de tejidos vegetales.
- FIG. 17. ONCIDIUM STRAMINEUM Batem. ex Lindl.
tomado de Icones orchidacearum I. 1990

Fig.1 Diagrama de flujo para la regeneración *in vitro* de Oncidium stramineum Batem. ex Lindl.

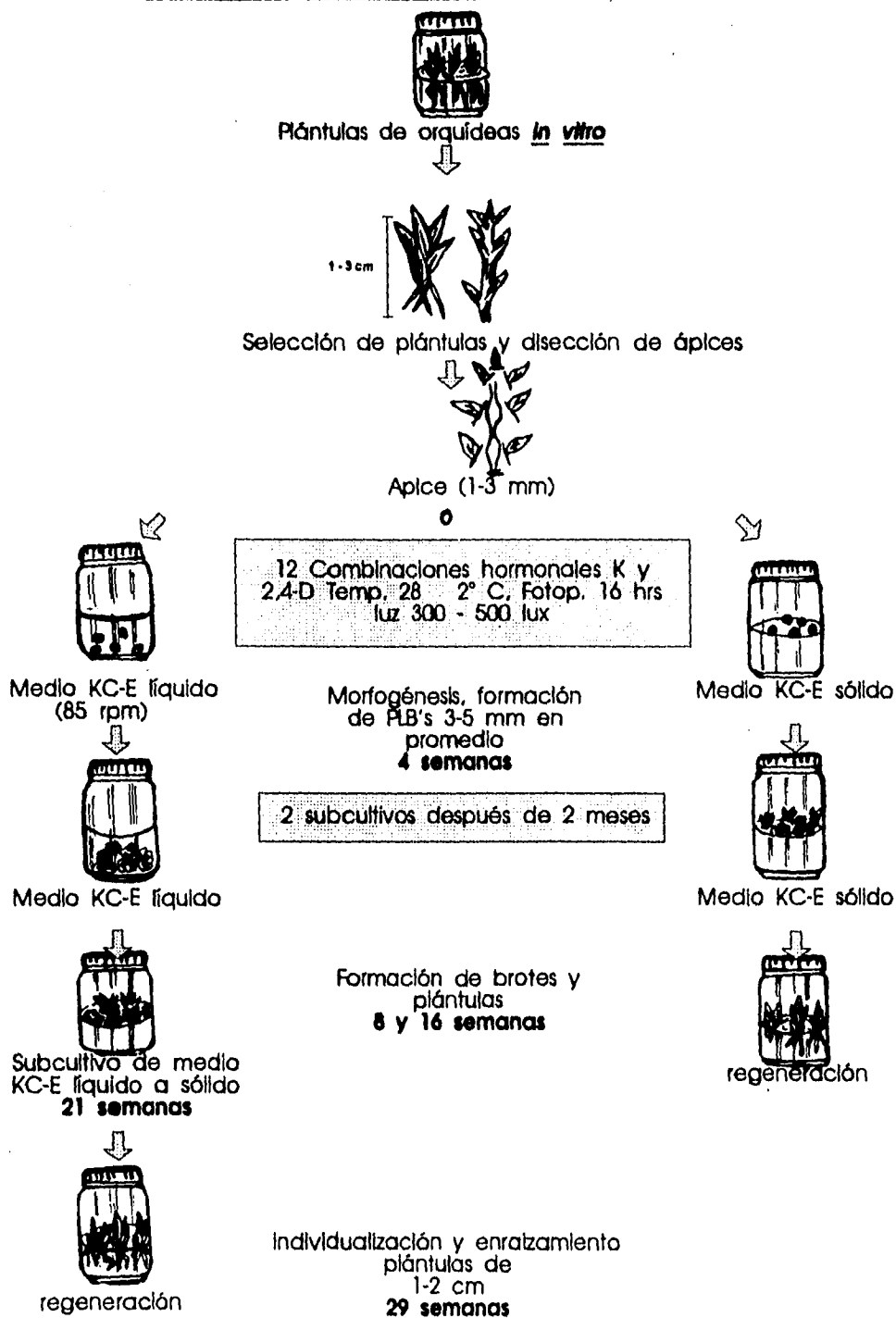


Fig. 2 Diagrama de flujo para la germinación asimbiótica de Oncidium stramineum Batem. ex Lindl.

(Trabajo realizado por Martínez 1991)

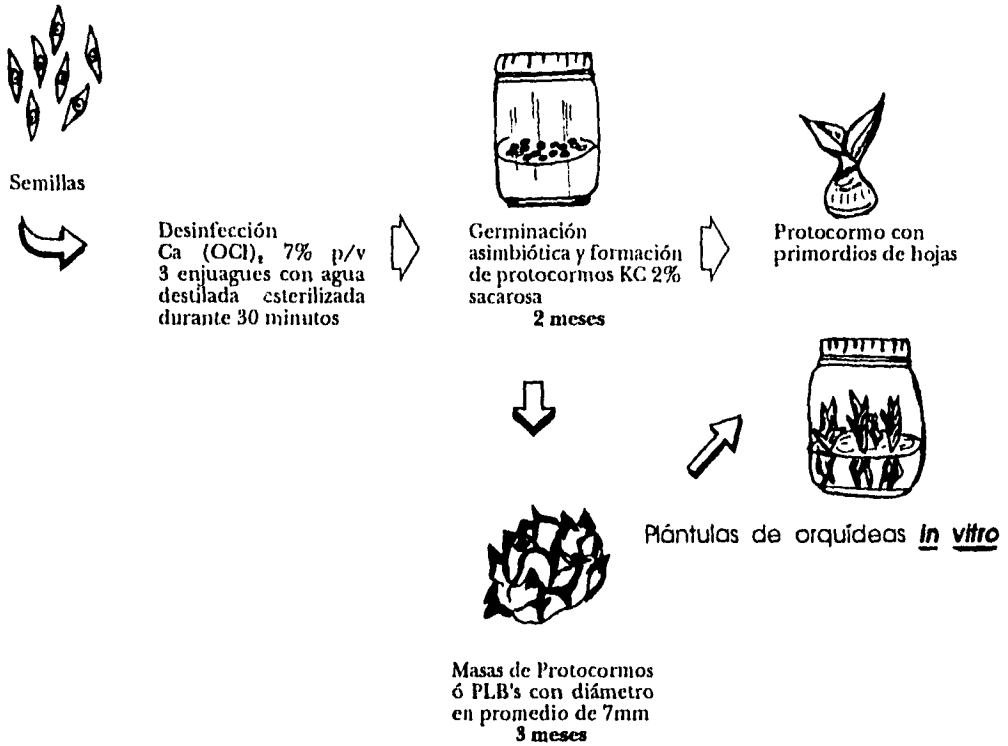




FIG. 3



FIG. 4



FIG. 5



FIG. 6

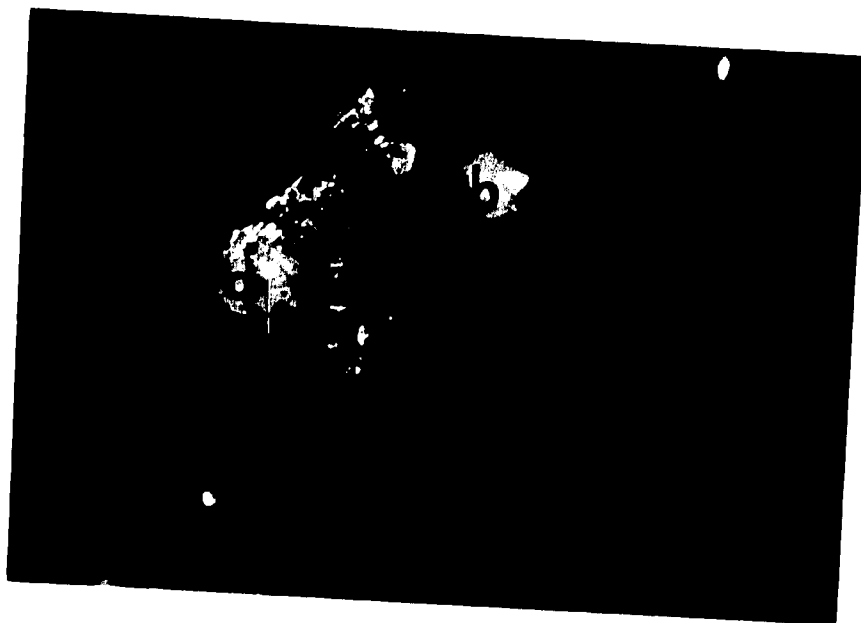


FIG. 7



FIG. 8

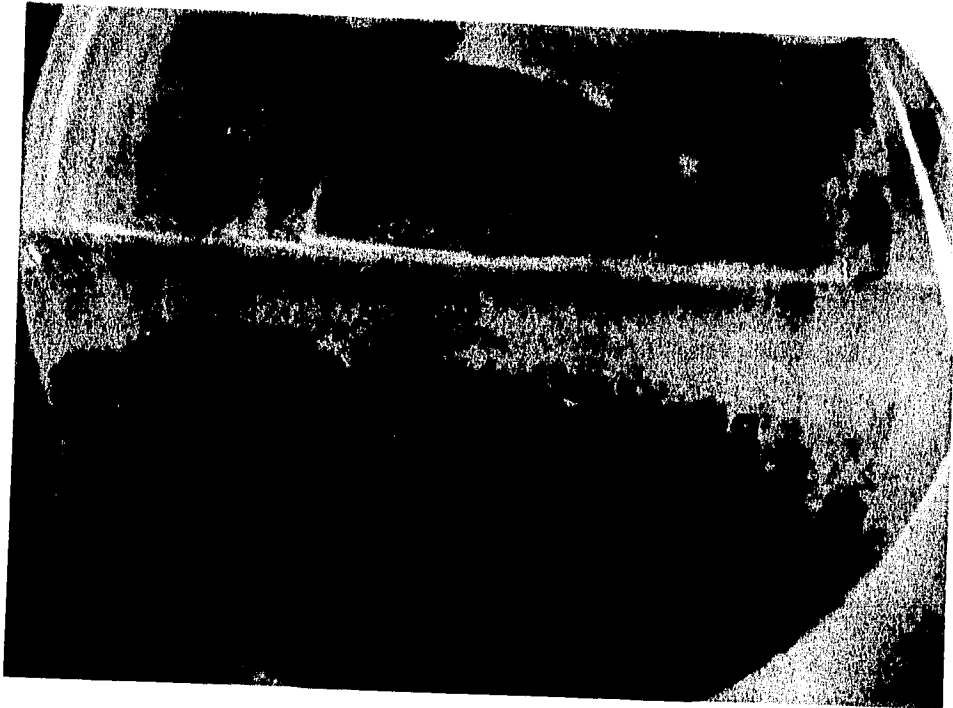


FIG. 9



FIG. 10

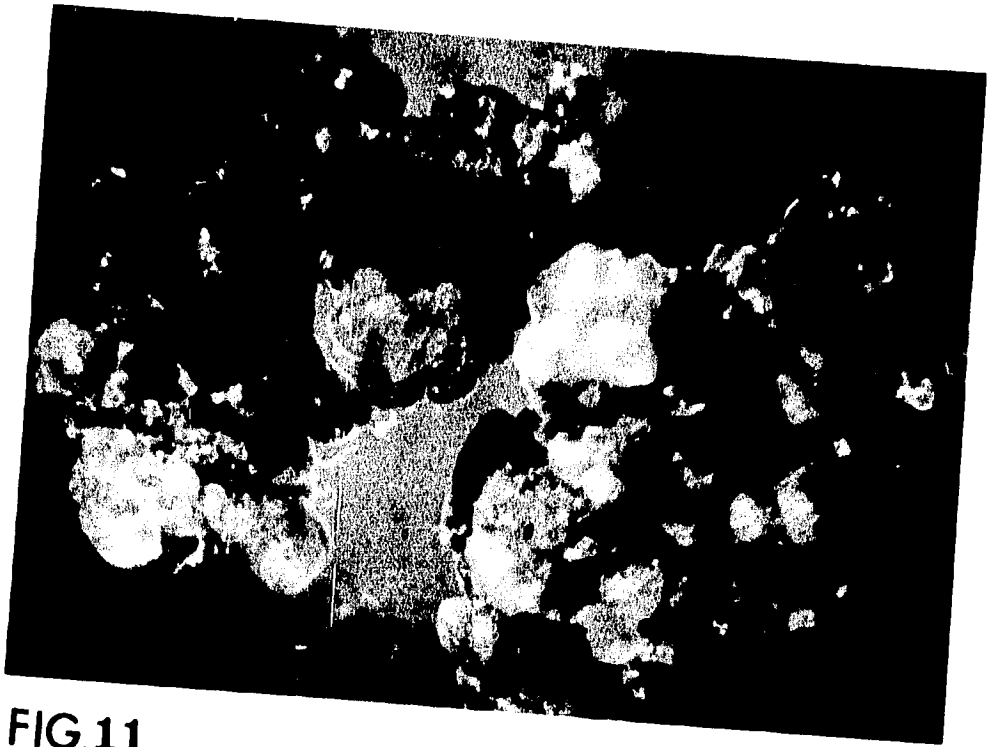


FIG.11



FIG. 12



FIG. 13

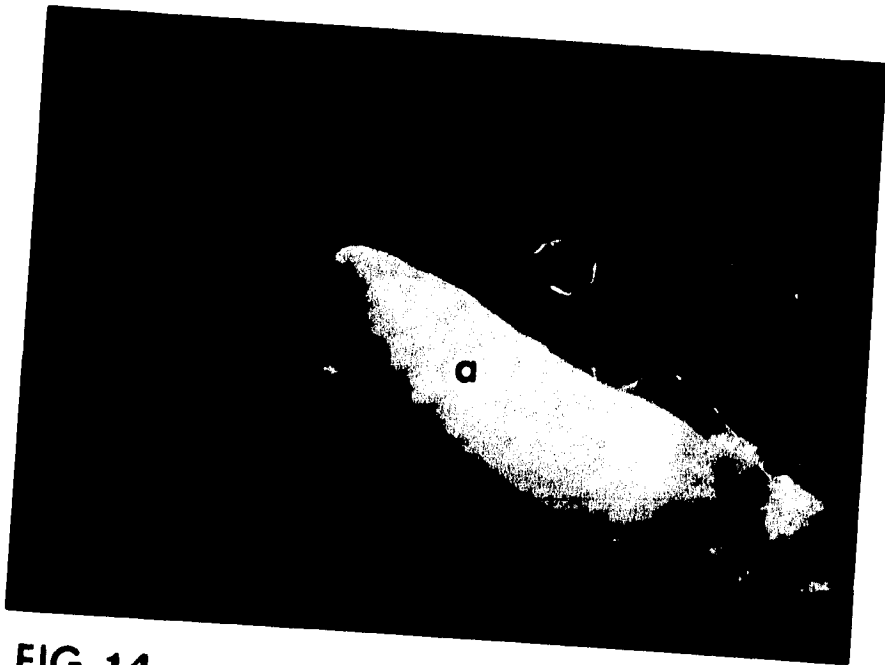


FIG. 14



FIG. 15



FIG. 16

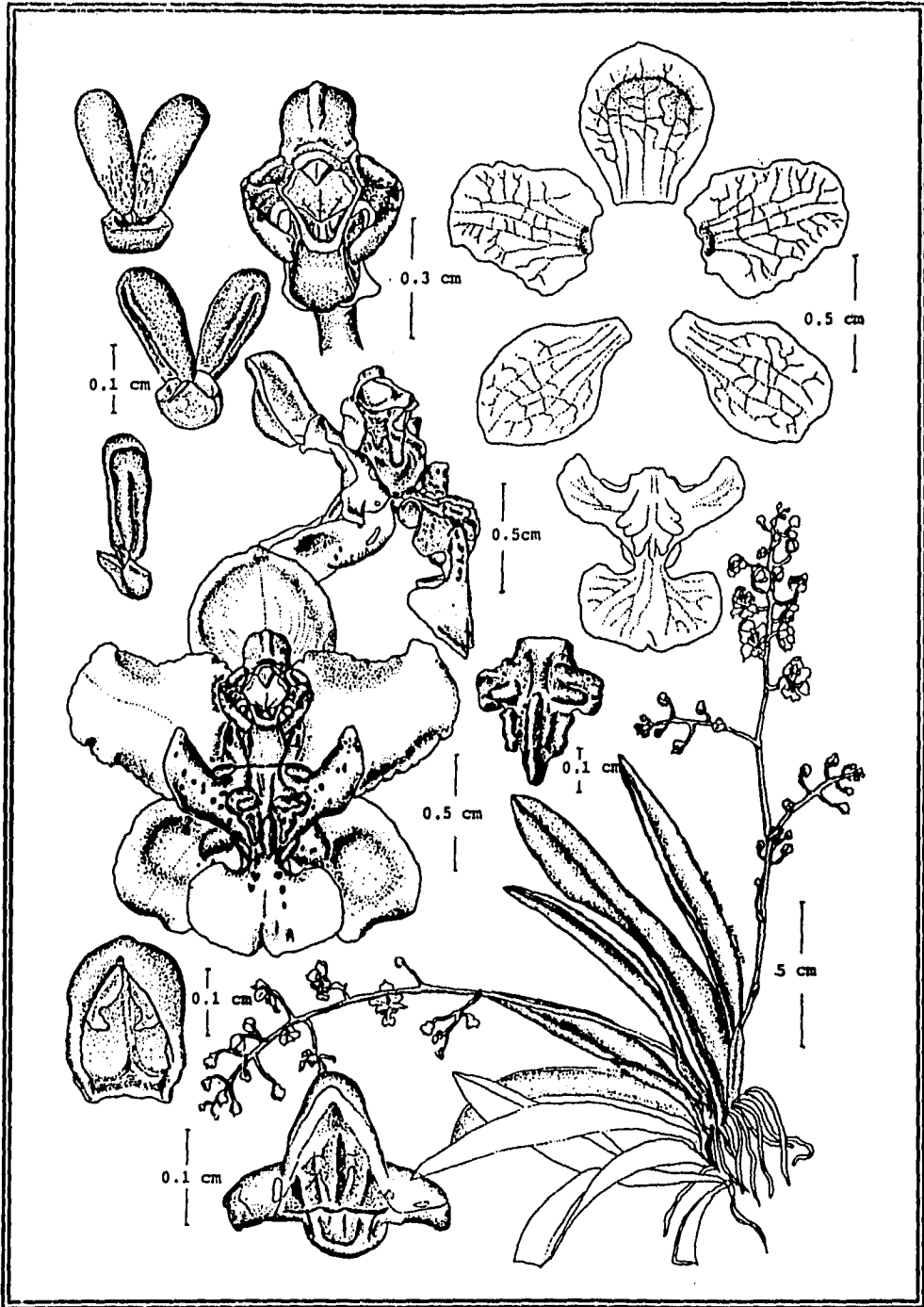


Fig.17 *ONCIDIUM STRAMINEUM* Batem. ex Lindl.
TOMADO DE ICONES ORCHIDACEARUM I. 1990

APENDICE 1. KC-E = MEDIO KNUDSON "C" (1946) ENRIQUECIDO
 PARA LA SIEMBRA DE APICES DE TALLO DE
Oncidium stramineum Batem. ex Lindl.

Nº	COMPONENTES	mg/l
1	MACRONUTRIMENTOS	
*a	Nitrato de clacio, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1000.00
b	Fosfato monobásico de potasio, KH_2PO_4	250.00
c	Sulfato de magnesio, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250.00
d	Sulfato de amonio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	500.00
e	Sulfato de manganeso, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	7.50
*f	Sulfato ferroso, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	25.00
2	MICRONUTRIMENTOS	
a	Acido bórico, H_3BO_3	0.056
b	Acido Molibdico, MoO_3	0.016
c	Sulfato cúprico, anhidro, CuSO_4	0.040
d	Sulfato de Zinc, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.331
e	Yoduro de potasio, KI	0.083
f	Cloruro de cobalto, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0025
3	VITAMINAS B5 (Gamborg et al., 1968)	
a	Acido nicotínico	1.00
b	Piridoxina-HCl	1.00
c	Tiamina-HCl	10.00
4	Myo-inositol	100.00
5	Sacarosa	20000.00
6	Agua destilada >aforar a	1000 ml
7	Agar bacteriológico	8-12 gr

> Después de aforar y antes de agregar el agar, ajustar el pH a 5.0 con KOH y/o HCL a 0.1 y 0.5 N.

* Pesar y agregar en orden al preparar el medio.

APENDICE 2. MEDIO DE CULTIVO KNUDSON "C" (KC) 1946.		
NUTRIMENTOS	mg/l	SOL. CONCENTRADA 10 x
Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1000.0	*
KH ₂ PO ₄	250.0	2500
MgSO ₄ .7 H ₂ O	250.0	2500
(NH ₄) ₂ SO ₄	500.0	5000
MnSO ₄ .4H ₂ O	7.5	75
FeSO ₄ .7H ₂ O	25.0	*
Sacarosa	20,000.0	
pH	5.0	
SOLIDIFICANTE		
Agar >	8000.0	
> El pH 5.0 se ajusta después de aforar y antes de agregar el agar con HCl y/o KOH a 0.1 y 0.5 N. • Pesar y agregar en orden al preparar el medio.		

Tabla A. EJEMPLOS DE ESPECIES QUE SE HA INVESTIGADO SU ALMACENAMIENTO EN NITROGENO LIQUIDO.

Clavel	Seibert, 1976
Fresa	Sakai <i>et al.</i> , 1978; Kartha <i>et al.</i> , 1980
Papa	Grout y Henshaw, 1978; Towill, 1981
Chícharo	Kartha <i>et al.</i> , 1979

Tomado de Hu y Wang, 1983

Tabla B. EJEMPLOS DE ESPECIES ECONOMICAMENTE IMPORTANTES QUE HAN SIDO PROPAGADAS POR CULTIVO DE TEJIDOS.

<u>Allium cepa</u>	<u>Lycopersicon esculentum</u>
<u>Allium sativum</u>	<u>Nephrolepis exaltata</u>
<u>Apium graveolens</u>	<u>Oryza sativa</u>
<u>Asparagus officinalis</u>	<u>Osumunda cinamomea</u>
<u>Avena sativa</u>	<u>Philodendron selloum</u>
<u>Bougainvillea glabra</u>	<u>Pinus spp.</u>
<u>Capsicum annum</u>	<u>Solanum tuberosum</u>
<u>Carica papaya</u>	<u>Vitis vinifera</u>
<u>Crassula argentea</u>	<u>Zea mays</u>
<u>Daucus carota</u>	

Tomado de Lozoya, 1985

Tabla C. ALGUNAS ESPECIES AMENAZADAS QUE HAN SIDO PROPAGADAS POR CULTIVO DE TEJIDOS.

Espe cie	Familia	Condición actual	Referencia
<u>Bletia urbana</u>	O	E	Chávez, 1980.
	O	E	Rubiuo, et.ai.1989.
	O	E	Martínez, 1985.
<u>Mammillaria san-angelensis</u>	C	Ex	Martínez-Vázquez y Rubiuo, 1989.
<u>M. huitzilopochtli</u>	C	E	Arriaga, 1994.
<u>Encyclia vitellina</u>	O		Ramírez, 1990.
<u>Laelia anceps</u>	O	E	Martínez, 1991.
<u>Lemboglossum ehrebergii</u>		E	Namorado, en preparación
<u>Lycaste aromatica</u>	O	V	Martínez, 1991.
<u>L. skinneri</u> var. <u>alba</u>	O	E	Martínez, 1991.
<u>L. skinneri</u> var. <u>skinneri</u>		E	Martínez, 1991.
<u>Oncidium stramineum</u>	O	E	Martínez, 1991.
<u>Rhyncholaelia glauca</u>			Martínez, 1991.
<u>Nesocodon mauritianus</u>			Fay y May, 1990
<u>Carrissa xylopicron</u>		V	Krogstrup, Norgaard y Hamann, 1990.
<u>Gastonia rodriguesiana</u>		E	"
<u>Mathurina penduliflora</u>		R	"
<u>Peperomia reticulata</u>		V	"
<u>Pittosporum balfourii</u>		E	"
<u>Turraea lacinata</u>		E	"
O= Orchidaceae		Ex=Extinta	
C= Cactaceae		V= Vulnerable	
E= Peligro de extinción		R= Rara	

TABLA 1

Respuestas Morfogénicas de ápices (a) de *Oncidium stramineum* Batem. ex Lindl., cultivados en medio nutritivo (b) *sólido* y evaluados en 3 tiempos de su desarrollo.

Tratamientos Nº	K/2,4-D mg/l	4 Semanas			8 Semanas			16 Semanas		
		ápices/resp.		Nº. Total de PLB's	ápices/resp.		Nº. Total de PLB's	ápices/resp.		Nº. Total de Brotos
		Nº	%		Nº	%		Nº	%	
1	0/0	13	65	8	12	60	17	11	55	29
2	0/1	13	65	6	13	65	14	13	65	21
3	0/2	12	60	10	12	60	18	11	55	36
4	1/0	16	80	23	16	80	42	16	80	89
5	1/2	10	50	7	10	50	16	9	45	25
6	1/3	12	60	8	12	60	19	12	60	30
7	2/0	15	75	5	15	75	14	15	75	18
8	2/1	16	80	15	15	75	29	14	70	57
9	2/2	12	60	10	12	60	20	12	60	38
10	3/0	10	50	11	10	50	21	9	45	40
11	3/1	13	65	9	12	60	17	2	60	33
12	3/2	10	50	8	10	50	15	9	45	29
TOTAL		152		120	149		242	133		445

(a) Apices de 1-3 mm de longitud, 20 ápices por tratamiento.

(b) Medio de cultivo Knudson "C"- enriquecido: KC-E (Martínez, 1991).

Temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, Fotoperíodo 16 hrs. luz y una intensidad luminosa de 300-500 lux
12 combinaciones hormonales de Kinetina (K) y Acido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)

TABLA 2

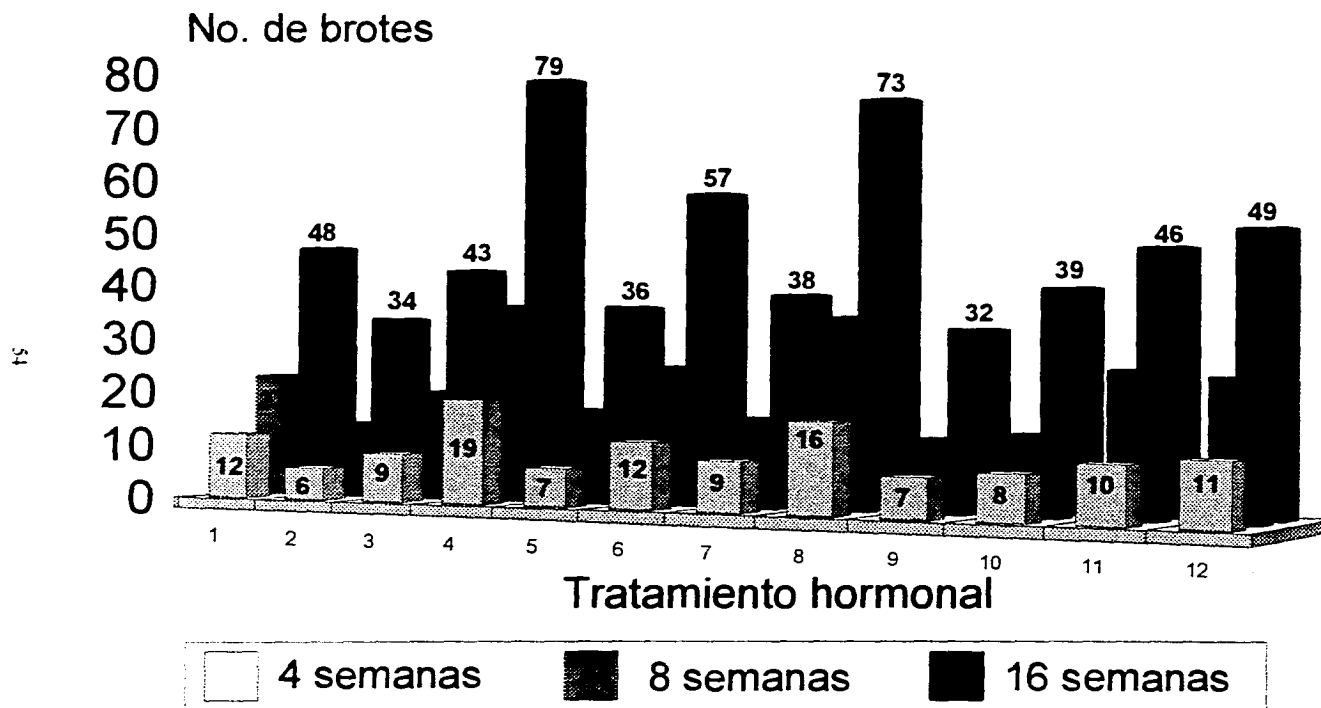
Respuestas Morfogenéticas de ápices (a) de *Oncidium stramineum Batem. ex Lindl.*, cultivados en medio nutritivo (b) *líquido* y evaluados en 3 tiempos de su desarrollo.

Tratamientos No.	K/2,4-D mg/l	4 Semanas			8 Semanas			16 Semanas		
		ápices/resp.		No. Total de PLB's	ápices/resp.		No. Total de PLB's	ápices/resp.		No. Total de Brotos
		No.	%		No.	%		No.	%	
1	0/0	13	65	12	12	60	24	11	55	48
2	0/1	19	95	6	16	80	14	13	65	34
3	0/2	19	95	9	17	85	20	15	75	43
4	1/0	13	65	19	12	60	36	10	50	79
5	1/2	15	75	7	15	75	17	15	75	36
6	1/3	9	45	12	9	45	25	8	40	57
7	2/0	16	80	9	16	80	16	16	80	38
8	2/1	12	60	16	12	60	34	12	60	73
9	2/2	16	80	7	16	80	13	14	70	32
10	3/0	15	75	8	15	75	14	15	75	39
11	3/1	17	85	10	16	80	25	14	70	46
12	3/2	13	75	11	11	55	24	10	50	49
TOTAL		177		126	167		261	153		574

- (a) Apices de 1-3 mm de longitud, 20 ápices por tratamiento.
 (b) Medio de cultivo Knudson "C"- enriquecido: KC-E (Martínez, 1991).

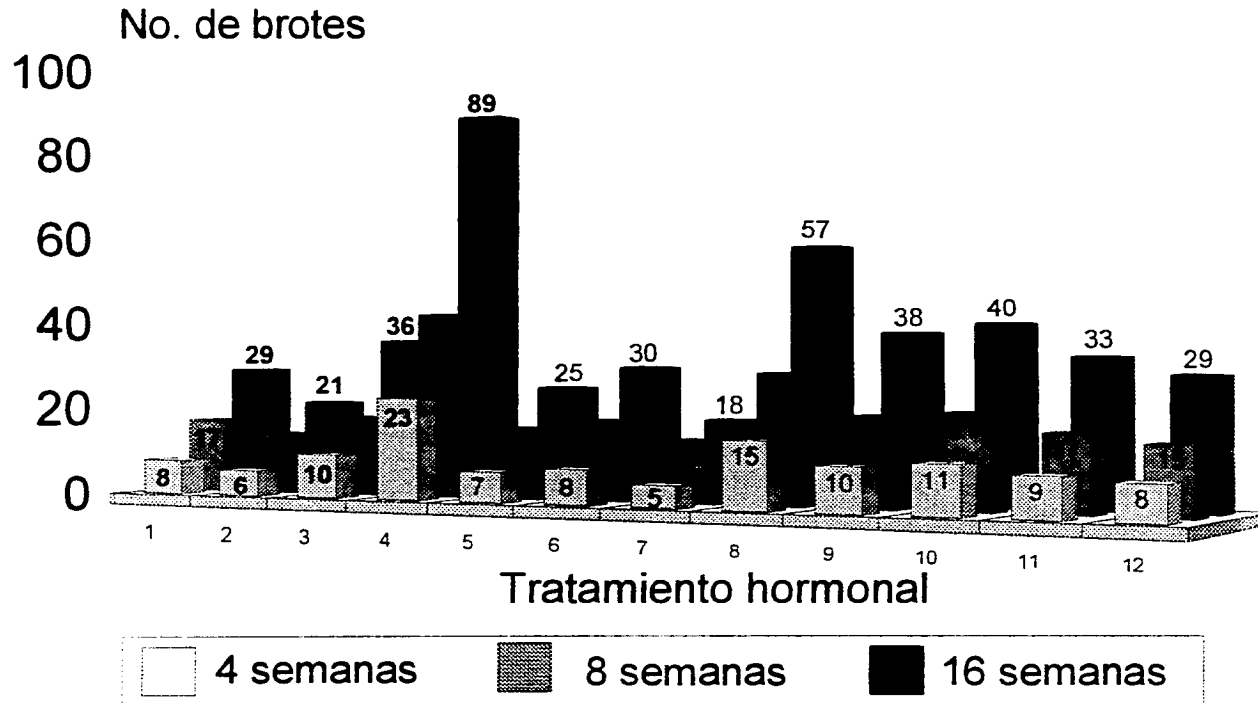
Temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, Fotoperíodo 16 hrs. luz, intensidad luminosa de 300-500 lux y agitación continua a 85 rpm con 12 combinaciones hormonales de Kinetina (K) y Acido 2,4-Diclorofenoacético (2,4-D)

Gráfica 1. Cultivo *in vitro* de ápices de *Oncidium stramineum* en medio líquido KC-E



Temperatura $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, Fotoperíodo 16 horas luz 300-500 lux y agitación continua a 85 rpm Medio de cultivo: KC enriquecido: KC-E
20 ápices por tratamiento

Gráfica 2. Cultivo *in vitro* de ápices de *Oncidium stramineum* en medio sólido KC-E

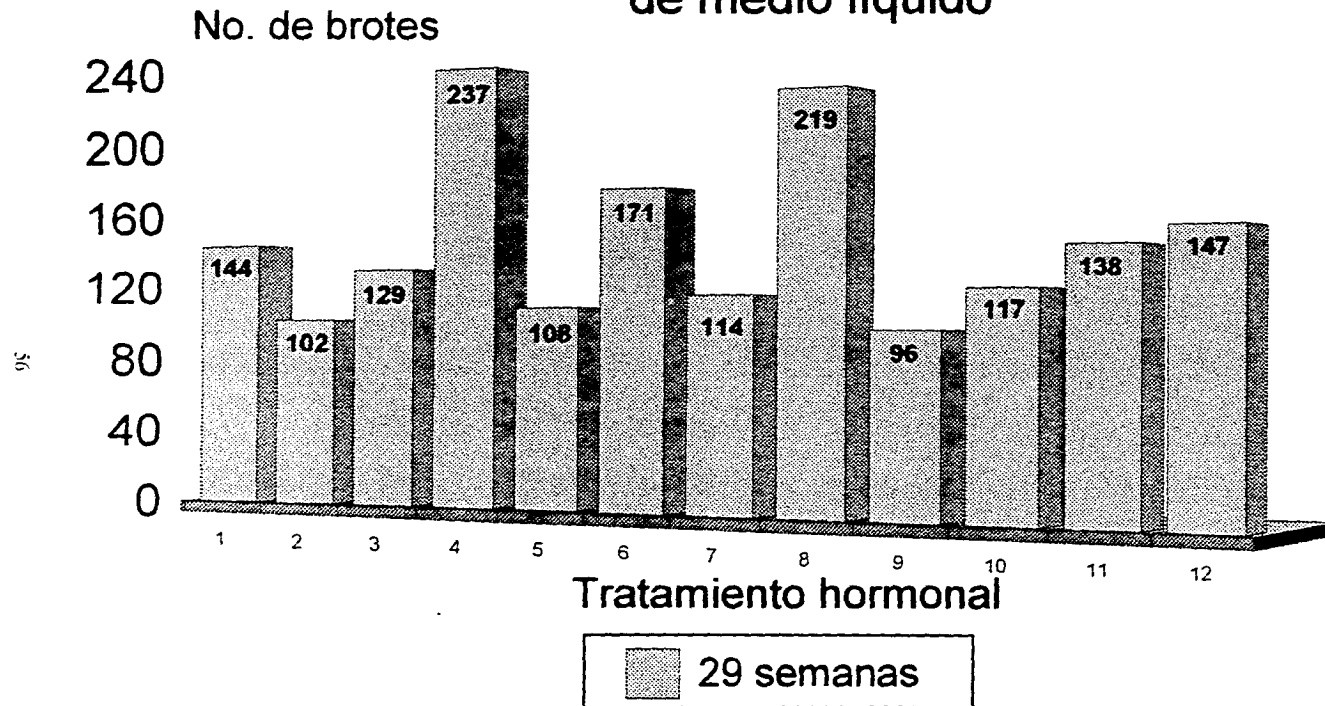


Temperatura $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, Fotoperíodo 16 horas luz 300-500 lux

Medio de cultivo: KC enriquecido: KC-E

20 ápices por tratamiento

Gráfica 3. Regeneración *in vitro* de brotes en medio sólido, de ápices de *Oncidium stramineum*, provenientes de medio líquido



Temperatura $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, Fotoperíodo 16 horas luz 300-500 lux
Medio de cultivo: KC enriquecido: KC-E

siembra inicial 20 ápices por tratamiento; 21 semanas en medio líquido; 8 semanas en medio sólido.

XII. BIBLIOGRAFIA

- ALLAN, L. 1989. Collectors' passion Threatens Orchids. W.W.F. News 61: 3.
- AMMIRATO, P.V., 1989. Recent Progress in Somatic Embryogenesis. Newsletter IAPTC 57: 2-16.
- ANONIMO, 1988. Biodiversity: the key role of plants. Threatened Plants Newsletter 19: 2-4.
- ANONIMO, 1990. A Clean Sheet of Dirty Paper. The Economist 314 (7648): 14-15.
- ARDITTI, J., 1966. Orchids. Scientific American 214: 70-78.
- ARDITTI, J., 1967. Factors Affecting the Germination of Orchid Seed. Bot. Rev. 33: 1-97.
- ARDITTI, J., 1977. Clonal Propagation of Orchids by Means of Tissue Culture - A Manual 203-293. En: J. Arditti (Ed.) Orchid Biology Reviews and Perspectives, 1. Cornell Univ. Press, Ithaca, New York.
- ARDITTI, J., 1992. Fundamentals of Orchid Biology. John Wiley and Sons, New York, 120-124.
- AUBOIRON, E., M.P. CARRON and N. MICHAUX-FERRERE. 1990. Influence of Atmospheric Gases, particularly Ethylene, on Somatic Embryogenesis of Hevea brasiliensis. Plant Cell Tissue and Organ Culture 21: 31-37.
- BERNARD, N., 1909. L'evolution dan la Symbiose, les Orchidées et leurs Champignons Commensaux Ann. Sci. Nat. Bot. Ser. 9(9): 1-196.
- BEVERSDORF, W.D., 1990. Micropropagation in Crop Species. En: H.J.J. Nijkamp, L.H.W. Van Der Plas and J. Van Aartrijk (Eds.). Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 3-12.
- BHALLA, P., 1991. Team Surveys War ravaged gulf. W.W.F News 73: 8
- BIDWELL, R.G.S., 1979. Fisiología Vegetal. AGT Editor, México. 784 p.
- B.G.C.I, La Variedad - La Clave de la Vida. Botanic Garden Conservation Secretariat. London.

- CHAVEZ, A.V.M., 1980. Cultivo Asimbiótico de Bletia urbana Dressler (Orchidaceae) especie endémica del Pedregal de San Angel. Tesis Profesional, Facultad de Ciencias, U.N.A.M. 81 p.
- CHAMPAGNAT, M. and G. MOREL. 1969. Multiplication Végétative des Cattleya a partir de bourgeons cultivées *in vitro* Soc Bot. Fr., Mémoires 116: 111-132.
- CORRELL, D.S., 1950. Native Orchids of North America, North of Mexico. Waltham, Chronica Botanica Company. Mass, U.S.A. 1-13.
- DAVEY, S. 1991. Environmental Blueprint for Europe 2000. W.W.F News 73: 4-5.
- DEBERGH, P.C. and P.E. READ, 1991. Micropropagation En: P.C. Debergh and R.H. Zimmerman (Eds) Micropropagation Technology and Application. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- DIXON, K. and E. BUNN, 1990. Micropropagation Research in Kings Park and Botanic Garden, Western Australia. Botanic Gardens Micropropagation News. 1: 2-4.
- DRESSLER, L.R. 1981. The Orchids, Natural History and Classification. Harvard University Press. 324 p.
- EHRlich, P. R. and E.O. WILSON, 1991. Biodiversity Studies: Science and Policy. Science 253: 758-762.
- EISINGER, W. 1983. Regulation of pea internode expansion by ethylene. Ann. Rev. Plant Physiol. 34: 225-240.
- ERNST, R., J.E. BJORNSEN, and J. ARDITI. 1992. Effects of ethephon, its nonethylene-generating analog ethylphosphonic acid, and phosphorous and in aseptic culture of orchids seedlings. American Journal of Botany 79: 275-278.
- FAY, M. and M. MAY, 1990. The *in vitro* Propagation of Nesocodon mauritanus. Botanic Gardens Micropropagation News. 1: 6-8
- FONNESBECH, M. 1972. Growth hormones and propagation of Cymbidium *in vitro* Physiol Plant. 27: 310-316.
- FRANCO, S., M.A. CUELLAR, 1994. México Sede de la 5a. Reunión del Comité de Plantas de la CITES. Boletín Amaranto Asociación Mexicana de Jardines Botánicos A.C. 7 (3):2-26

ESTO DEBE DE SER
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- GAMBORG, O.L., R.A. MILLER and K. OJIMA, 1968. Plant Cell Cultures. I. Nutrient requirements of Suspension Cultures of Soybean root cells. Exp. Cell Res. 50: 151-158.
- GEORGE, E.F. and P.D. SHERRINGTON, 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetic Limited, Great Britain.
- HAGSATER, E. y G.A. SALAZAR (Eds.) 1990. ICONES ORCHIDACEARUM. Fascicle I. Orchids of Mexico Part 1 A.M.O. A.C. Mexico D.F.
- HERRERA, E., A. GARCIA y E. LINARES, 1993. Directorio de los Jardines Botánicos de México. Publicación especial No. 1 Asociación Mexicana de Jardines Botánicos A.C. México D.F. 63 p.
- HINRICHSEN, D. 1990. Population Boom Takes Environmental Toll. W.W.F News 65: 4-5.
- HINRICHSEN, D. 1991. The Danube-No-Longer Blue. W.W.F News 70: 4-5.
- HU, C.Y. and P.J. WANG. 1983. Meristem Shoot-tip and Bud Culture. En: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada (Eds.) Handbook of Plant Cell Culture Vol. 1. Techniques for Propagation and Breeding. Macmillan Publishing Co., New York 177-227.
- INTUWONG, O. and Y. SAGAWA, 1974. Clonal propagation of Phalaenopsis by shoot tip culture. Amer. Orchid Soc. Bull. 43: 893-895.
- INTUWONG, O. and Y. SAGAWA, 1975. Clonal propagation of Dendrobium Golden Wave on other Noble types. Amer. Orchid Soc. Bull. 44: 319-32.
- IRIONDO, J.M. and C. PEREZ, 1990. Application of *in vitro* culture Techniques to the Conservation of Iberian Endemic Plant Species. Botanic Garden Micropropagation News. 1: 4-6.
- I.U.C.N. (International Union for Conservation of Nature), 1983 y 1985 Rare and Threatened Plant List. Threatened Plant Committee Botanic Gardens Conservations, Coordinating Body, Kew, England.
- JENSEN, D.D. 1959. Virus disease of orchids. En: C.L. Withner (Ed). 1959. The Orchids: Scientific Survey Ronald Press Co. New York 431-458.

- JIMENEZ, R., 1990. *Oncidium stramineum* Batem ex Lindl. En: E. Hágsater and G.A. Salazar (Ed.), *Icones Orchidacearum, Orchids of Mexico. Asociación Mexicana de Orquideología A.M.O. A.C. Lámina 79.*
- KAKO, S. 1973. Clonal propagation of *Cattleya* through shoot meristem culture. *Japan Agric. Res. Quart* 7: 109-115.
- KARTHA, K.K., 1982. Cryopreservation of Germoplasm Using Meristem and Tissue Culture En: D.T. Tomes, B.E. Ellis, P.M. Harney, K.J. Kasha and R.L. Peterson (Eds), *Application of Plant Cell and Tissue Culture to Agriculture and Industry.* University of Guelph, Canada 139-161.
- KEMF, E. 1990. Traffic Europe to Stamp out Billion Dollar Wildlife Trade. *W.W.F News* 67: 3.
- KEMF, E. 1991. Oil and Smog Smother War-Thorn Gulf. *W.W.F News* 70: 1.
- KEYFITZ, N. 1989. El Crecimiento Demográfico. *Scientific American* 158: 73-83.
- KIM, K.- K., J. T. KUNISAKI, and Y. SAGAWA. 1970. Shoot tip culture of *Dendrobium*. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 39: 1077-1080.
- KNUDSON, L. 1922. Nonsymbiotic Germination of Orchid Seeds. *Bot. Gaz.* 73(1): 1-25.
- KNUDSON, L. 1946. A New Nutrient Solution for the Germination of Orchid Seeds. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 15: 214-217.
- KROGSTRUP, J.V. NORGAARD and O. HAMANN, 1990. Micropropagation of Threatened Endemic and Indigenous Plant Species from the Island of Rodrigues. *Botanic Garden Micropropagation News.* 1: 8-12.
- KUNISAKI, J. T., K.K. KIM, and Y. SAGAWA. 1972. Shoot-tip culture of *Vanda*. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 41: 435-439.
- LINDEMANN, E.G., P. GUNKEL, and O.W. DAVIDSON, 1970. Meristem culture of *Cattleya*. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 39: 1002-1004.
- LOZOYA, S.H., 1985. Micropropagación de Especies Herbáceas. En: M. Robert, y V.M. Loyola, (Comp.) *El Cultivo de Tejidos Vegetales en México.* CICY y CONACYT, México 65-79.

- LUCAS, G. and H. SYNGE (Compiladores) 1980. The IUCN Plant Red Data Book. IUCN-WWF, Morges, Switzerland, 540 p.
- MackNIGHT, J., 1988. Threatened Plants. Newsletter 19: 11-12.
- MARSTON, M.E., and P. VORAUAI. 1967. Multiplication of Orchid Clones by shoot meristem culture. A review of the literature. Univ. Nottingham, Dept. Hort., Misc. Pub. 17: 1-8.
- MARTIN, C. 1985. Cultivo de Plantas en Probeta. Mundo Científico 5 (44): 160-169.
- MARTINEZ-VAZQUEZ, O. and A. RUBLUO. 1989. *In vitro* Mass Propagation of the Near-Extinct Mammillaria san-angelensis Sánchez-Mejorada. Journal of Horticultural Science. 64(1): 99-105.
- MARTINEZ, P. A., 1985. Inducción *in vitro* de Brotación Múltiple de Bletia urbana Dressler (Orchidaceae) a partir de Protocormos Seccionados. Tesis profesional, Facultad de Ciencias, U.N.A.M. 66 p.
- MARTINEZ, P.A. 1991. Propagación Masiva *in vitro* y Recuperación de Poblaciones de Orquídeas en Peligro de Extinción. Tesis Maestría, U.N.A.M., México, 100 p.
- MONTES DE OCA, 1963. Colibríes y Orquídeas de México. Fournier, México. 34 p.
- MOORE, J., 1988. Horticultural Science in a Changing World. HortScience 23: 799-803.
- MOREL, G.M. 1960. Producing virus-free Cymbidiums. Amer Orchid Soc. Bull. 29: 495-497.
- MOREL, G.M. 1963. La culture *in vitro* du méristème apical de certaines orchidées Compt. Rend. Acad. Sci. Paris 256: 4955-4957.
- MOREL, G.M. 1964a. Tissue Culture - a new means of clonal propagation of orchids. Amer. Orchid Soc. Bull. 33: 473-478.
- MOREL, G.M. 1964b. La culture *in vitro* du méristème apical. Rev. Cytol. Biol. Vég. 27: 304-314.
- MOREL, G.M. 1970. Neues auf dem Gebiet der Meristem Forschung. Die Orchidee 20: 433-443.

- MOREL, G.M. 1971. Les "Plelones". Culture multiplication. Orchidophile 6: 8-94.
- MOREL, G.M. 1974. Clonal multiplication of orchids. En: C-L. Withner (Ed.), The orchids: scientific studies, Wiley-Interscience, New York 169-222.
- MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio-Assays with Tobacco Tissue Culture. Physiol. Plant. 15:473-497.
- MURASHIGE, T., 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant. Physiol. 25: 135-166.
- NIEDERWIESER, J.G. and J. VAN STADEN. 1992. Interaction between benzyladenine, naphthaleneacetic acid and tissue age on adventitious bud formation of leaf sections of Lachenalia hybrids. S. Afr. J. Bot. 58: 13-16.
- PAREDES, L.O. 1986. La Biotecnología de Plantas; una herramienta estratégica en los programas agroalimentarios de México. Ciencia y Desarrollo Año XII (68): 26-43.
- PREEN, T., 1991. Arabian Gulf Oil Spill Update. Species 16: 28-29
- PRITCHARD, A.E. 1959. Orchid Pest and Their Control. En: C.L. Withner (Ed.) The Orchids: A Scientific Survey New York 459-475.
- RAMIREZ FUENTES, M.C., 1990. Establecimiento del Cultivo *in vitro* de Orquídeas Mexicanas en Peligro de Extinción. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 64 p.
- RAO, A.N., 1977. Tissue Culture in the Orchid Industry 44-69 En: J. Reinert and Y.P.S. Bajaj (Eds.), Applied and fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer Verlag, Berlin.
- REID, W.V., 1992. Conserving Life's Diversity. Environ. Sci. Technol 26: 1090-1095
- REINERT, R.A., and H.C. MOHR. 1967. Propagation of Cattleya by tissue culture of lateral bud meristem Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 91: 664-671.
- ROBERT, M. and V.M. LOYOLA, 1984. Plant Tissue Culture. ATAS Bulletin 1. Tissue Culture, 80-81.
- ROBERT, M. y V.M. LOYOLA, (Comp.) 1985. El Cultivo de Tejidos Vegetales en México En: M. Robert y V.M. Loyola, (Comp.) El Cultivo de Tejidos Vegetales en México. CICY y CONACYT, México 21-26.

- RUBLUO, A., V.M. CHAVEZ, and A. MARTINEZ, 1989. *In vitro* Seed Germination and Re-Introduction of Bletia urbana (Orchidaceae) In Its Natural Habitat. Lindleyana 4: 68-73.
- RUBLUO, A., V. CHAVEZ, A.P. MARTINEZ and O. MARTINEZ-VAZQUEZ, 1993. Strategies for the Recovery of Endangered Orchids and Cacti Through *in vitro* Culture. Biological Conservation 63: 163-169.
- RZEDOWSKI, J., 1978. Vegetación de México. Ilmusu, México. 432 p.
- SAGAWA, Y. 1961. Vegetative propagation of Phalaenopsis stem cuttings Amer. Orchid. Soc. Bull. 18: 808-809.
- SAGAWA, Y., T. SHOJI, and T. SHOJI. 1966. Clonal Propagation of Cymbidiums through shoot meristem culture. Amer. Orchid Soc. Bull. 35: 118-122.
- SAGAWA, Y., and T. SHOJI. 1967. Clonal Propagation of dendrobiums through shoot meristem culture. Amer. Orchid Soc. Bull. 36: 856-859.
- SAGAWA, Y. and J. T. KUNISAKI, 1982. Clonal Propagation of Orchids by Tissue Culture En: A. Fujiwara (Ed.), Proceeding 5th International TI Congress Plant Tissue and Cell Culture. Tokio 683-684.
- SCULLY, R.M., Jr. 1967. Aspects of meristem culture in the Cattleya alliance. Amer. Orchid Soc. Bull. 36: 103-108.
- SEDUE, 1991a. Las Areas Naturales Protegidas en la Conservación de las Especies. En Simpósio sobre Evaluación, Recuperación, Propagación y Mantenimiento de Plantas en Peligro de Extinción. Inst. Biol. UNAM, SEDUE, Red Latinoamericana de Botánica, Rancho Santa Ana Botanic Garden, CUCC, México (en prensa).
- SEDUE, 1991b. Flora y Fauna. Aprovechamiento y Conservación. México Desconocido Año XV (177): 107.
- SEDUE, 1991c. Acuerdo por el que se establecen los criterios ecológicos CT-CERN-001-91 que determinan las especies raras, amenazadas, en peligro de extinción o sujetas a protección especial y sus endemismos, de la flora y la fauna terrestres y acuáticas en la República Mexicana. Diario Oficial de la Federación de México. 17 de mayo de 1991. Tomo 452 No.12 p. 7-36

- SEDESOL, 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-059 ECOL-1994, que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestres, terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial y que establece especificaciones para su protección Diario Oficial de la Federación de México. Lunes 16 de mayo de 1994. Tomo 488 No. 10 p. 2-25.
- SCHNEIDER, S.H. 1989. Un Clima Cambiante. Scientific American 158: 32-41.
- SCHILDE-RENTSHLER, L., N. ESTRADA, R. ESPINOZA and R. LIZARRAGA, 1982. *In vitro* Storage and distribution of potato germplasm, En: A. Fujiwara (Ed.), Plant Tissue Culture Tokyo. 781-782.
- SOULÉ, M.E., 1991. Conservation: Tactics for a Constant Crisis. Science 253:744-750.
- SOTO, M.A. 1988. Listado actualizado de las orquídeas de México. Orquídea (Méx.). 11: 233-277.
- SOTO, M.A. y E. HAGSATER, 1990. Algunas Ideas acerca de la conservación de las orquídeas mexicanas y un listado preliminar de los taxa amenazados En: J.L. Camarillo y F. Rivera (compiladores). Áreas Naturales en México y Especies en Extinción, U.N.A.M. México. 155-172.
- STEWART, J. 1989. Orchid propagation by tissue culture techniques-past, present and future En: H. W. Pritchard (Ed.) Modern Methods In Orchid Conservation: The role of physiology, ecology and management. Cambridge University Press, Cambridge, 87-100.
- TANAKA, R. and H. HAMEMOTO, 1974. List of Chromosome Numbers In Species of the Orchidaceae, En: C.L. Withner (Ed.) The Orchids, Scientific Studies. John Wiley And Sons, New York. 411-483.
- THOMAS, D.S. and T. MURASHIGE, 1979. Volatil Emission of Plant Tissue Cultures. 2. Effect of the AuxIn 2,4-D on Production of Volatiles In Callus Cultures. In vitro 15: 659-663.
- THORPE, T. (Ed.), 1978. Frontiers of Plant Tissue Culture 1978. Proc. 4th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture 1978. IAPTC, Calgary.
- TISSERAT, B., 1985. Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration. En: R.A. Dixon (Ed.) Plant Cell Culture, a Practical Research. IRL Press, Oxford, Washington D.C. 79-105.

- TISSERAT, B. and T. MURASHIGE, 1977a. Effects of ethephon, ethylene and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid on asexual embryogenesis *in vitro*. Plant Physiol. 60:437-439.
- TISSERAT, B. and T. MURASHIGE, 1977b. Probable identity of substances in Citrus that repress asexual embryogenesis. *In vitro* 13: 785
- TOLEDO, V.M., 1988. La Diversidad Biológica de México. Ciencia y Desarrollo Año XIV (81): 17-30.
- TEO, C.K.H., J.T. KUNISAKI, and Y. SAGAWA. 1973. Clonal propagation of strap-leafed Vanda by shoot tip culture. Amer. Orchid Soc. Bull. 42: 402-405.
- TSE, A.T.-Y., R. J. SMITH, and W. P. HACKETT. 1971. Adventitious shoot formation of Phalaenopsis nodes. Amer. Orchid Soc. Bull. 40: 807-810.
- VACHEROT, M. 1966. Meristem tissue culture propagation of orchids. Proceeding 5th World Orchid Conf., Long Beach, 23-26.
- VAJRABHAYA, M., and T. VAJRABHAYA. 1970. Tissue Culture of Rhynchostylis gigantea, a monopodial orchid. Amer. Orchid Soc. Bull. 39: 907-910.
- VOVIDES, A.P., 1989. Problems of Endangered Species Conservation in Mexico: Cycads an Example. Encephalartos 20: 29-35.
- WANN, S.R., M.A. JHONSON, T.L. NOLAND, and J.A. CARLSON, 1987. Biochemical Differences Between Embryogenic and Nonembryogenic Callus of Picea abies (L.) Karst. Plant Cell Rep 6: 39-42.
- WETHERELL, D.F., 1984. Enhanced Adventive Embryogenesis resulting from Plasmolysis of Cultured Wild Carrot Cells. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 3: 221-227.
- WILLIAMS, L.O., 1951. The Orchidaceae of México. Celba 2(4): 298 p.
- WILSON, E.O., 1989. Threats to Biodiversity. Scientific American 261:108-116.
- WILSON, R. 1984., Population and Natural Resources: A Statement (IUCN/IPPF). Earthwatch 16: 1-7.
- WIMBER, D.E. 1963., Clonal multiplication of Cymbidiums through tissue culture of the shoot meristem. Amer. Orchid Soc. Bull. 32: 105-107

- WIMBER, D.E. 1965., Additional observations of clonal multiplication of *Cymbidiums* through cultures of shoot meristem. Cymbidium Soc News 20: 7-10.
- WITHNER, C.L. 1975. The Orchids A Scientific Survey, Ronald Press, New York 648 p.
- WITHERS, L. 1985., Cryopreservation of Cultured Plant Cells and Protoplasts. En: K.K. Kartha (Ed.). Cryopreservation of Plant Cells and Organs. CRC. Press Inc., Boca Raton.
- WOCHOK, Z.S., 1981., The Role of Tissue Culture in Preserving Threatened and Endangered Plant Species. Biological Conservation 20: 83-89.
- YANG, C., W. WILKSCH and A. WILD. 1994. 1- Aminocyclopropane-1-Carboxilic Acid, its Malonyl Conjugate and 1- Aminocyclopropane-1- Carboxilate Synthase Activity in Needles of Damaged and Undamaged Norway Spruce Trees. J. Plant Physiol. 143: 389-395.