

90

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

VIABILIDAD DE LAS SEMILLAS DE TRES
ESPECIES DE ORQUÍDEAS DEL VALLE DE
TEHUACÁN, PUEBLA, BAJO CONDICIONES DE
ALMACENAMIENTO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

MARÍA VERÓNICA ORTÍZ MONROY.

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. ERNESTO AGUIRRE LEÓN

297596

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO 2001.



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.

Un científico es una persona a la que el sistema educativo no ha logrado destruir su curiosidad de niño y sigue preguntándose cosas como: ¿Porqué el cielo es azul?.

León Lederman (Premio Nobel de Física, 1988).

Nuestro tan alabado progreso tecnológico y en general, el avance de la civilización, podría ser comparado a un hacha en manos de un criminal patológico.

Albert Einstein

Lo que ahora se considera realizado, antes fue imaginado.

William Blake

Los pobres necesitan de nosotros, pero es menor la necesidad que nosotros tenemos de los pobres. La mayor pobreza consiste en no ser amados.

Madre Teresa de Calcuta

Dedicatorias

A Dios por brindarme la oportunidad de conocer y disfrutar la vida.

A mis padres Meche y Baldomero, por su apoyo, amor, paciencia, comprensión y por darme la oportunidad del conocimiento.

A mis hermanos, porque hemos compartido las alegrías y sinsabores de la vida familiar y en especial al chachito por su apoyo tanto moral como tecnológico.

A mis amigos de la secundaria Armando, Javier y Raúl, por su apoyo incondicional.

A mis amigos de la Universidad Arely, Jorge, Nacho, Omar, Mauricio, Daniel, Héctor, Natalia, Juan C., Juan O., Beto, Abel y Moni, por permitirme tomar parte en alegrías, enojos, logros y la inquietud por el conocer las cosas que nos rodean, todo esto gracias a que compartimos algo en común, la Biología.

Y de manera muy especial quiero hacer un agradecimiento a Toño, porque ha estado a mi lado en los momentos más importantes y críticos de mi vida, siempre apoyándome, animándome y conservando la esperanza a pesar de que las cosas a veces no funcionan como esperamos, gracias por todo güero.

Agradecimientos

A mi asesor, M. en C. Ernesto Aguirre León, por sus enseñanzas, apoyo y confianza durante este tiempo de trabajo y convivencia.

A mis revisores de tesis M. en C. Alberto Arriaga Frias, Biól. Hugo V. Perales Vela, M. en C. Gerardo Ortíz Montiel y Biól. Manuel Mandujano Piña por sus comentarios.

Al Dr. Luis Arturo Baiza y al Dr Alfonso Lugo, quienes brindaron las facilidades para la realización de la técnica de fluorescencia; al Biól. Agustín Vargas por su asesoría en la parte estadística.

A Irma Castillo y José Martínez por su apoyo y comprensión incondicional.

A mis compañeras de laboratorio, Magda, Lucy, Sol, Lyz y Lety, por su respaldo, porras y momentos de convivencia.

A mis profesores Gustavo Valencia, Gerardo Ortíz, Ernesto Aguirre, Enrique Martínez, Eduardo Barrera, Rafael Chávez, Rosa Olivia Cañizares, Héctor Barrera, Efraín Garrido y David Gonzáles, por sus enseñanzas, orientación y apoyo durante la carrera .

INDICE

INDICE DE FIGURAS	ii
INDICE DE TABLAS	iv
RÉSUMEN	v
INTRODUCCIÓN	1
Generalidades de la familia Orchidaceae	3
ANTECEDENTES	7
1. Viabilidad y germinación en orquídeas	7
2. El Valle de Tehuacán, Puebla	15
3. Descripción de las especies de estudio	17
a) <i>Encyclia hanburii</i>	17
b) <i>Laelia albida</i>	17
c) <i>Oncidium brachyandrum</i>	19
OBJETIVOS	20
METODOLOGÍA	21
I. Colecta de las semillas.	21
II. Almacenamiento de las semillas.	21
III. Peso de las semillas.	21
IV. Prueba de viabilidad con Cloruro de 2,3,5-Trifeniltetrazolio (TTC).	22
V. Análisis estadístico	23
VI. Prueba de viabilidad con diacetato de fluoresceína (FDA).	23
VII. Germinación.	23
VIII. Cuantificación de la germinación.	24
IX. Correlación de la viabilidad con la germinación.	25
RESULTADOS	27
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIONES	60
APÉNDICE	62
BIBLIOGRAFÍA	63

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.- Desarrollo de una orquídea.	9
Figura 2.- Reacción del de Cloruro 2,3,5-Trifeniltetrazolio.	13
Figura 3.- <i>Encyclia hanburii</i> .	17
Figura 4.- <i>Laelia albida</i> .	18
Figura 5.- <i>Oncidium brachyandrum</i> .	19
Figura 6.- Número de embriones teñidos (viables) de las tres especies estudiadas.	27
Figura 7.- Número de embriones no teñidos (no viables) de las tres especies estudiadas.	28
Figura 8.- Número de semillas sin embrión de las tres especies estudiadas.	28
Figura 9.-Porcentaje de viabilidad de <i>Encyclia hanburii</i> .	29
Figura 10.-Porcentaje de semillas no viables de <i>Encyclia hanburii</i> .	30
Figura 11.-Porcentaje de semillas sin embrión de <i>Encyclia hanburii</i> .	30
Figura 12.- Interacción entre los medios de cultivo y gelificantes en la germinación de <i>Encyclia hanburii</i> .	31
Figura 13.- Porcentaje de germinación de <i>Encyclia hanburii</i> .	32
Figura 14.- Peso promedio de las semillas de <i>Encyclia hanburii</i> .	32
Figura 15.- Correlación entre el porcentaje de viabilidad y de germinación de <i>Encyclia hanburii</i> , observada en el medio KC4003-agar.	33
Figura 16.- Correlación entre el porcentaje de viabilidad y de germinación de <i>Encyclia hanburii</i> , observada en el medio KC4128-gelrite.	33
Figura 17.-Correlación entre el porcentaje de viabilidad y peso de las semilla de <i>Encyclia hanburii</i> .	34
Figura 18.- Semillas de <i>Encyclia hanburii</i> tratadas con TTC.	34
Figura 19.-Porcentaje de viabilidad de <i>Laelia albida</i> .	35
Figura 20.-Porcentaje de semillas no viables de <i>Laelia albida</i> .	35
Figura 21.-Porcentaje de semillas sin embrión de <i>Laelia albida</i> .	36

Figura 22.- Interacción entre los medios de cultivo y gelificantes en la germinación de <i>Laelia albida</i> .	37
Figura 23.-Porcentaje de germinación de <i>Laelia albida</i> en el medio KC4128-gelrite.	37
Figura 24.-Peso promedio de las semillas de <i>Laelia albida</i> .	38
Figura 25.-Correlación entre el porcentaje de viabilidad y el de germinación de <i>Laelia albida</i> , observada con el medio KC4128 gelrite.	38
Figura 26.-Correlación entre el porcentaje de viabilidad y peso de las semillas de <i>Laelia albida</i> .	39
Figura 27.- Semillas de <i>Laelia albida</i> tratadas con TTC.	39
Figura 28.-Porcentaje de viabilidad de <i>Oncidium brachyandrum</i> ,.	40
Figura 29.-Porcentaje de semillas no viables de <i>Oncidium brachyandrum</i> .	41
Figura 30.-Porcentaje de semillas sin embrión de <i>Oncidium brachyandrum</i> .	41
Figura 31.- Interacción entre los gelificantes en la germinación de <i>Oncidium brachyandrum</i> , en el medio de cultivo KC4003.	42
Figura 32.-Porcentaje de semillas sin embrión de <i>Oncidium brachyandrum</i> .	42
Figura 33.-Peso promedio de las semillas de <i>Oncidium brachyandrum</i> .	43
Figura 34.-Correlación entre el porcentaje de viabilidad y el de germinación de <i>Oncidium brachyandrum</i> , observada en el medio KC4003-agar.	43
Figura 35.-Correlación entre el porcentaje de viabilidad y el de germinación de <i>Oncidium brachyandrum</i> , observada del medio KC4003-gelrite.	44
Figura 36.-Correlación entre el porcentaje de viabilidad y peso de <i>Oncidium brachyandrum</i> .	44
Figura 37.- Semillas de <i>Oncidium brachyandrum</i> con TTC.	45
Figura 38.- Germinación de semillas de <i>Encyclia hanburii</i> , <i>Laelia albida</i> , y <i>Oncidium brachyandrum</i> .	45
Figura 39.- Comparación del porcentaje de viabilidad (TTC vs FDA), de las tres especies estudiadas.	47
Figura 40.- Semillas de <i>Encyclia hanburii</i> , tratadas con FDA.	47
Figura 41.- Semillas de <i>Laelia albida</i> tratadas con FDA.	48
Figura 42.- Semillas de <i>Oncidium brachyandrum</i> tratadas con FDA.	48

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1.- Participación proporcional estimada de los principales tipos de vegetación en México de la flora fanerógama .	2
Tabla 2. Pretratamientos que se aplicaron a las semillas de las tres especies de orquídeas estudiadas.	22
Tabla 3. Tiempos del pretratamientos óptimos y de incubación con TTC, determinados por la prueba de LSD de Fisher, para cada una de las especies estudiadas.	49
Tabla 4. Número de días en que tardaron en germinar las semillas de tres especies de orquídeas.	50

RESUMEN.

Las orquídeas representan el mayor grupo de plantas con flores, caracterizándose por su diversidad de formas, adaptaciones y distribución en muchos nichos ecológicos; su viabilidad natural puede durar semanas, meses, incluso algunos años. La información reunida para las especies mexicanas, es escasa y hace falta para más de 1000 especies que viven en el país, tornándose importante el manejo de éstas y otras plantas en bancos de recursos fitogenéticos. El presente trabajo aporta información sobre viabilidad y germinación de las semillas de tres especies *Encyclia hanburii*, *Laelia albida* y *Oncidium brachyadrum*, del Valle de Tehuacán Puebla, almacenadas bajo condiciones estándares, para orientar el manejo de las semillas a largo plazo, con fines de conservación.

Las semillas maduras de *Encyclia hanburii*, *Laelia albida* y *Oncidium brachyadrum* fueron almacenadas a 4 °C en bolsas de papel sobre CaCl_2 , se les aplicó el método de detección de viabilidad de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) durante 24, 48, 72 y 96 hrs de incubación, siendo además necesario el empleo de los pretratamientos: agua destilada, NaOCl 2.5, 5, 10, 15% y $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 5% + 1% Tween 80, con un tiempo de incubación de 1 y 24 hrs para optimizar la respuesta al TTC. Se seleccionó el pretratamiento adecuado para cada especie por la prueba de DMS. Por microscopía óptica se detectó: a) embriones rojos, b) embriones amarillos o blancos y c) semillas sin embrión. Se determinaron peso, viabilidad y germinación de las semillas, durante 8 meses, a través de 10 repeticiones con 100 semillas cada una, por tratamiento y para cada especie de orquídea. Finalmente, se compararon los resultados de viabilidad detectados con TTC y diacetato de fluoresceína (FDA).

Los resultados para cada caso fueron los siguientes: 1) *Encyclia hanburii*: el pretratamiento más favorable fue de 24 hrs de incubación con agua destilada; durante su almacenamiento disminuyó la viabilidad y la germinación, mientras que el porcentaje de viabilidad fue más alto al determinarse con FDA. No hubo correlación estadística entre viabilidad y germinación, pero sí entre viabilidad y peso. 2) *Laelia albida*: el pretratamiento efectivo fue de 24 hrs de incubación en $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 5% + 1% Tween 80, descendiendo su viabilidad y germinación, estadísticamente no hubo correlación entre viabilidad y germinación ni entre viabilidad y peso. El FDA produjo mejores resultados en comparación con TTC. 3) *Oncidium brachyadrum*: el pretratamiento apropiado fue de 1 hr de incubación en $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 5% + 1% Tween 80; decreció viabilidad y germinación durante el almacenamiento. Sí hubo correlación matemática entre viabilidad y germinación, pero no entre viabilidad y peso. No hubo diferencias entre las pruebas de TTC y FDA para determinar la viabilidad.

El método de TTC con las modificaciones señaladas para cada especie fue en general satisfactorio para determinar la viabilidad de las semillas. La viabilidad y germinación se deterioraron durante el tiempo de almacenamiento. El FDA presentó resultados equiparables o mayor al TTC en *Encyclia hanburii* y *Laelia albida*. Los resultados obtenidos de las pruebas de viabilidad complementadas con los datos de germinación permiten establecer una base práctica para el manejo de estas y otras especies en bancos de germoplasma.

INTRODUCCIÓN

Se ha hablado y escrito mucho acerca de la rápida reducción de la superficie de muchos ecosistemas terrestres, que ponen en peligro la persistencia de sus componentes animales y vegetales, conduciendo al borde de la extinción a muchas de ellas. Este proceso resulta particularmente grave en un país inmensamente rico en especies de plantas como es México, ya que debido a sus características como son: situación geográfica, topografía y diferencias climáticas, se produce una amplia diversidad en la riqueza faunística y florística (Soto, 1990; Vázquez-Yanes, 1987).

México ocupa el tercer lugar entre los países con mayor diversidad biológica, es el primero por su fauna de reptiles (717 especies), el segundo en mamíferos (449 especies), el cuarto en anfibios (282 especies); la flora de México esta estimada en alrededor de 220 familias, 2 410 géneros y 22 000 especies. Aproximadamente 10% de géneros y 52% de las especies son endémicas, y este es más pronunciado en la zonas xerófitas y de pastizal (tabla 1). Por todas estas razones, cualquier pérdida o reducción de la riqueza de especies de México, es no sólo una disminución de la riqueza nacional, sino también una gran pérdida para el patrimonio natural de la humanidad (Rzedowski, 1993; Soto, 1990; Williams, 1997).

El grueso de estos elementos endémicos de la flora corresponde a una serie de zonas ecológicas de mayor extensión, entre las cuales destacan: a) las zonas áridas sonorenses, chihuahuenses y la del valle de Tehuacán - Cuicatlán y en menor grado también queretano - hidalguense y la tamaulipeca; b) el conjunto de las principales cordilleras, como las sierras madres occidental, oriental y del sur, el eje volcánico transversal, los sistemas montañosos de Chiapas, del norte de Oaxaca y del noroeste de Baja California y c) el área de "tierra caliente" de la vertiente del Pacífico, desde Sonora hasta Chiapas, incluyendo la extensa depresión de la cuenca del río Balsas (Rzedowski, 1997).

Tipo de vegetación	Cobertura aproximada de cada tipo de vegetación en México (%)	Riqueza florística estimada en cada tipo de vegetación	
		No. de especies	Porcentaje de flora total
Matorral xerófito y pastizal	50	6 000	20
Bosque coníferas y encinos	21	7 000	24
Bosque mesófilos de niebla	1	3 000	10
Bosque tropical perinifolio	11	5 000	17

Tabla 1.- Participación proporcional estimada de los principales tipos de vegetación en México de la flora fanerógama (Rzedowski, 1993).

De acuerdo a Rzedowski (1997), la proporción de endemismo de algunas de las familias de la flora fanerógama de México son Cactaceae, Rubiaceae y Compositae alrededor de 70% de especies, Gramineae y Orchidaceae registran 25 y 35% respectivamente.

Sin embargo, la diversidad biológica de cualquier país es frágil y en México, esta ha sido mermada con el incremento en la presión ejercida por los núcleos humanos. En los últimos sesenta años, el enorme crecimiento de la población, la ganadería extensiva, la intensificación agrícola, el crecimiento urbano desorganizado y el inadecuado uso de los recursos naturales ha conducido a la reducción en gran escala, en ocasiones a niveles alarmantes, a la vegetación original (Soto, 1990; Rzedowski, 1997).

El problema de la destrucción de los hábitats no es tan simple; muchos factores interactúan, la mayoría de los países no son capaces de implementar programas de educación ambiental especialmente en poblados alejados, en lo profundo de los bosques o en los campos (Luna, 1982; Rubluo, 1993), donde la conservación es difícil cuando va acompañada de prioridades fundamentales como son comida, refugio, salud y educación que no han sido satisfechas, como ejemplo, está el caso de la población de escasos recursos, que desprovisto de suficientes fuentes de trabajo e ingresos fijos aprovechan los recursos silvestres, como animales y plantas, entre las segundas se encuentran las orquídeas para venderlas a gran escala

a los compradores aficionados o comerciales tanto nacionales como extranjeros. (Brune, 1988; Pritchard, 1993).

Las medidas que usualmente se toman en diferentes países para evitar la pérdida de especies de plantas en peligro consisten en la creación de reservas territoriales naturales para proteger las comunidades donde las especies viven; emitir normas y reglamentos para salvaguardar legalmente ciertas especies, de manera que no puedan ser explotadas, colectadas o perjudicadas de cualquier forma, además de conservar las especies en condiciones controladas, ya sean jardines, invernaderos, bancos de semillas o de cultivo de tejidos. Lógicamente, cualquier medida de las mencionadas requiere conocer con relativa profundidad acerca de las especies a proteger (Vázquez-Yanez, 1986).

Generalidades de la familia Orchidaceae.

Las orquídeas son plantas con flores que pertenecen a la familia Orchidaceae y constituyen la mayor familia de plantas vasculares que existe. Estimaciones de su número señalan que hay aproximadamente 20 000 especies distribuidas por todo el mundo, con excepción de las regiones polares y los desiertos más áridos. Hay ejemplares tan grandes como un árbol (*Grammatophyllum speciosum*), y miniaturas con flores tan pequeñas como la cabeza de un alfiler como es el caso de *Bulbophyllum* (Bechtel, 1992; Soto, 1990).

Las características más distintivas de este grupo de plantas son:

- a) Generalmente nada más un estambre es fértil.
- b) La flor presenta tres sépalos y tres pétalos, uno de los cuales se ha modificado, dándosele el nombre de labelo.
- c) Sus órganos sexuales forman la columna.
- d) La flor presenta resupinación.
- e) Los granos de polen se agrupan en masas compactas o polineas.
- f) Produce una gran cantidad de semillas muy pequeñas.

Las orquídeas son de todas las monocotiledóneas las más complejas en estructura y adaptación, exhiben notables especializaciones de polinización y presenta avanzados sistemas de almacenamiento de agua (Bechtel, 1992; Wiard, 1987).

De acuerdo con su forma de vida, se tienen cuatro tipos de orquídeas: epífitas, litófilas o rupícolas, terrestres y saprófitas (Bechtel, 1992; Wiard, 1987).

Los tallos de muchas orquídeas se desarrollan en estructuras hinchadas llamadas pseudobulbos, los cuales actúan como órganos de almacenamiento de agua y sustancias nutritivas, como su nombre lo implica, son bulbos no verdaderos, son tallos especializados y sirven como reservorios de alimento y humedad. No poseen internudos y varían en su largo, espesor y forma, siendo esférica, elíptica, parecido a una pera, etc., muchas veces ayudan a la identificación de un género o especie (Bechtel, 1992; Wiard, 1987).

Las raíces de las orquídeas epífitas y litófitas difieren de las terrestres, estas últimas poseen pelos radicales, mientras que en el caso de *Cattleyas* y *Oncidium*, son adventicios, ellas producen un tallo primario (el rizoma) y en la base un nuevo tallo secundario (los pseudobulbos). Las raíces ayudan a las orquídeas a sujetarse a las rocas o árboles. Están cubiertas por dos capas de epidermis, una capa exterior de cutina en la cual descansa el velamen y la segunda capa interior de células esponjosas que absorben y retienen la humedad y el alimento. Cuando esta húmedo, el velamen se torna verde o verdoso, retornando a su color normal blanquizco o grisáceo. Las orquídeas tienen dos tipos de crecimiento: monopodial, cuando el tallo o eje principal crece hacia arriba año tras año y simpodial, cuando cada nuevo crecimiento se desarrolla lateralmente a partir de la base de lo anterior generalmente conocido como rizoma (Bechtel, 1992; Wiard, 1987).

Las flores no son solamente la parte más vistosa de las orquídeas, también están encargadas de asegurar la producción de semillas, la multiplicación y conservación de las especies. Las flores pueden aparecer en forma solitaria (*Lycaste*, *Anguloa*); en forma de fascículo (varias flores con pedúnculo independiente, como sucede con las *Maxillaria*), o en inflorescencia

propriadamente dichas (varias flores en un sistema ramificada, como el género *Oncidium*), (Bechtel, 1992; Soto, 1990).

Hay muchos patrones diferentes de floración en las orquídeas; especies que florecen por muchas semanas, o tienen flores que duran poco tiempo, no es difícil que se logre un grado de sincronía; sin embargo, la sincronía se logra en las orquídeas que presentan la floración gregaria, estas plantas producen flores de vida corta pero están sincronizadas o casi todas las plantas de una especie florecen en una misma mañana (Bechtel, 1992; Luna,1995).

La enorme variabilidad de las orquídeas como grupo, está en la complejidad de los mecanismos de polinización que se presentan en la familia. La polinización en el caso de las orquídeas no resulta tan simple y sencilla como las demás plantas; existen mecanismos y agentes polinizadores específicos para cada especie, representando, en consecuencia, un proceso de alta especialización. La polinización en las orquídeas es tan precisa que es imposible que un agente no específico, como lo sería la lluvia o el viento, sirvan de polinizadores; esto deja a las aves, mariposas diurnas y nocturnas, moscas y abejas como agentes polinizantes del vasto número de variaciones florales que tiene la familia, la relación con respecto al porcentaje de especies de orquídeas polinizadas por cada categoría es, más o menos, el siguiente: abejas 60%, moscas 15%, mariposas diurnas 8%, mariposas nocturnas 3%, aves 3% (Luna,1995).

De acuerdo al modo de distribución las orquídeas caen en dos categorías: tropicales y templadas. Los países tropicales e intertropicales son los que poseen ciertos géneros de orquídeas que en su mayoría son epífitas. Al alejarse del trópico se encuentran menos plantas de este tipo y en cambio, abundan las terrestres que prefieren en su gran mayoría, las zonas templado-frescas o frías (Luna,1995).

Las orquídeas han sido una de las plantas más admiradas y apreciadas desde hace muchos siglos por diferentes civilizaciones, los Chinos cultivaron algunas especies del género *Cymbidium*; en el México Prehispánico ya se usaba la vainilla, además de emplear algunas especies de orquídeas (*Arpophyllum spicatum* , *Encyclia citrina*) como plantas medicinales, mientras que *Encyclia venenosa* para la obtención de mucilagos o "tzacuhtli" que fue importante para elaborar adhesivos (Soto, 1990).

Un aspecto sobresaliente es que las orquídeas, aún aquellas en peligro de extinción, son un recurso susceptible de ser manejado, si se aumentara la propagación artificial de orquídeas, pues en muchos casos su cultivo es económicamente rentable (Soto, 1990).

1. Viabilidad y germinación en orquídeas.

Aunque las orquídeas epífitas han sido rutinariamente desarrolladas de semillas por más de 60 años usando el método asimbiótico desarrollado por Knudson (1922), es relativamente poco el avance conseguido sobre el conocimiento de técnicas para el manejo, aprovechamiento y almacenamiento de estas semillas en la mayoría de las especies conocidas de orquídeas. Es sorprendente, especialmente si se observa la rápida pérdida de muchos hábitats con la inminente amenaza de la extinción de un gran número de especies de orquídeas silvestres. Knudson (1934, citado por Seaton, 1989) señaló la necesidad de almacenar semillas para asegurarlas contra cualquier fracaso de germinación o la pérdida accidental de semillas.

La estructura y el tamaño de las semillas de orquídeas están entre las características más llamativas; son diminutas, pesan de 0.3 a 14 μg y la medida promedio es de 0.250 a 1.2 mm en longitud y 0.090 a 0.270 mm en lo ancho. Se producen en grandes cantidades, de 1 300 a 4 000 000 semillas por cápsula, en general, las semillas constan de una testa gruesa (cubierta seminal), que encierra un embrión con alrededor de 100 células (Arditti, 1967; Pierik, 1990; Royal, s/a).

Estructuralmente, pueden distinguirse dos grupos importantes de semillas de orquídeas. Un pequeño número de especies pueden tener embriones relativamente diferenciados incluyendo un cotiledón rudimentario, por ejemplo *Sobria macrantha* Lindl y *Bletilla hyacinthia* Rchbf, que son algo más fáciles de germinar. Sin embargo, la mayoría de las especies tienen semillas relativamente indiferenciadas, ningún cotiledón y ningún endospermo. En el grupo anterior el embrión está adjunto a la testa de la semilla por medio de varias células o hebras finas. La testa consiste de células relativamente indiferenciadas, mayormente isodiamétricas con citoplasma granulado y conspicuos núcleos. La cubierta tiene un aspecto exterior característico, en forma de red, que es diferente para cada especie. Considerando al embrión que casi siempre retiene su forma esférica o globular, la testa puede variar, siendo elíptica, fusiforme, redonda, globular, en forma de mariposa. Las testas en las semillas pueden ser mucho más grandes que el embrión o tan grandes como el embrión; ésta puede ser angular o

redonda; larga o corta, transparente, translúcida u opaca. Esta, normalmente consiste de material membranosa seco entrelazado con las paredes de las células espesas. Las testas de las semillas de *Selenipedium* son escleróticas, considerando a las de *Cypripedium*, *Paphiopedilum* y *Phragmipedium* que son delgadas y con testas reticuladas (Arditti, 1967; Pierik, 1990; Royal, s/a).

El embrión tiene una forma redondeada o esférica: la mayor parte de las semillas de orquídeas están escasamente diferenciadas: no se distinguen cotiledones ni raíces y no contienen endospermo. En el extremo distal del embrión existe un punto de crecimiento potencial, no identificable en el estado de semilla. Las células del embrión presentan una estructura simple, son isodiamétricas y escasamente diferenciadas (Arditti, 1967; Pierik, 1990; Royal, s/a).

De acuerdo con Arditti (1967), Harley (1969) y Pierik et. al. (citado por Pierik, 1990) la germinación de las semillas de orquídeas tienen lugar de la siguiente forma: El agua entra a través de la testa, aumentando de volumen de la semilla, después se inicia la división celular, rompiendo el embrión la cubierta seminal. A continuación se forma una estructura denominada protocormo (figura 1), a partir del agregado de células, y sobre aquel puede distinguirse un meristemo del vástago. Tan pronto como se inicia la diferenciación de órganos (meristemo del vástago en un lado y rizoides en el opuesto), comienza un período de crecimiento intenso. Si el protocormo está a la luz, adquiere un color verde y al mismo tiempo se desarrollan las hojas. Como resultado de la formación de clorofila la planta se hace autótrofa; más tarde las primeras raíces auténticas se forman endógenamente; el protocormo y los rizoides, pierden su misión nutritiva y desaparecen (Arditti, 1967; Pierik, 1990; Royal, s/a).

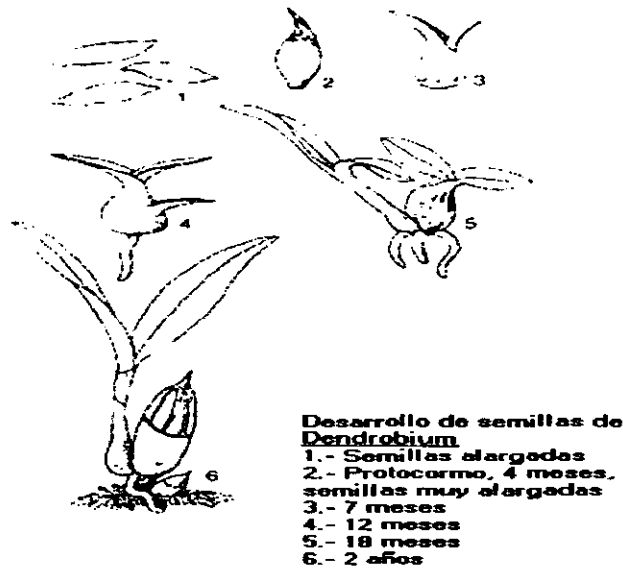


Fig 1.- Desarrollo de una orquídea desde semilla hasta plántula (Bechtel, 1992).

Las reservas alimenticias importantes en las semillas de orquídeas parecen ser los lípidos. El análisis químico de semillas de *Cymbidium* han mostrado contener 32% de grasa, 1% de azúcar y ninguno de almidón. Pruebas microquímicas de semillas de *Cypripedium parviflorum* han mostrado, que en las semillas las paredes de la testa contienen depósitos irregulares de lignina y celulosa sobre las paredes en fajas o barra, no se detectó cutina. En algunas especies las testas de las semillas pueden impregnarse con sustancias capaces de inhibir o disminuir la germinación. A pesar de ser diminutas y de fragilidad aparente, las semillas de orquídeas pueden resistir y sobrevivir tratamientos químicos relativamente severos, las experimentaciones con agentes descontaminantes han mostrado que pueden resistir por lo menos 5% de peróxido de hidrógeno hasta 10 minutos (Arditti, 1967; Pierik, 1990).

Las orquídeas crecen satisfactoriamente si se produce una solución con los nutrientes minerales adecuados como también la fuente de azúcar. Probablemente el medio más empleado en la propagación in vitro de orquídeas es el medio Knudson C y desde su descubrimiento hasta nuestros días ha sufrido modificaciones, lo cual ha permitido abrir nuevas alternativas (Thompson, 1977).

La información disponible sobre la germinación de semillas en orquídeas sugiere que puede ser dividida en tres categorías o grupos a este respecto. Un grupo consta de epífitas y litófitas tropicales que en general germinan fácilmente bajo condiciones asimbióticas. Este grupo incluye diversos taxa como *Cattleya*, *Phaius*, *Dendrobium* y *Cymbidium*. En el segundo grupo las especies terrestres tropicales, principalmente *Paphiopedilum*, son mucho más difíciles de germinar asimbióticamente y pueden requerir de medio especial. El tercer grupo consistente en terrestres de clima templado. Estas orquídeas no germinan bajo condiciones asimbióticas, o lo hacen muy pobremente y por lo general, son mucho más dependientes de la simbiosis (Yam, 1988).

En nuestros días, la conservación de especies amenazadas y en peligro de extinción así como la planeación de bancos de semillas y otros tipos de almacenamiento a largo tiempo, ha generado la necesidad de mayor información acerca de la longevidad y métodos de ensayo de viabilidad de semillas de orquídeas, ya que: 1) son diminutas, 2) parecen ser delicadas, 3) generalmente carecen de cotiledones y/o endospermo, 4) requieren de asociación micorrítica para su germinación en condiciones naturales, 5) muchas son germinadas *in vitro* y bajo condiciones axénicas en el laboratorio y 6) son producidas en gran número (1 300 - 4 000 000), (Arditti, 1967; Soushtari, 1994).

Efectuando pruebas periódicas de germinación y viabilidad, es posible determinar por cuanto tiempo y bajo que condiciones es que el material de una especie está disponible para su utilización. Tales métodos existen pero en algunas ocasiones es necesario adecuarlos al tipo de semilla. De acuerdo a Fast (1982) y Harvais (1982, citado por Van Waes, 1986a), la restricción del desarrollo de métodos de propagación prácticos de orquídeas es debido a la carencia de semillas viables; Harvais (citado por Van Waes, 1986a) también puntualiza: "Como no conocemos una prueba para la viabilidad de las semillas de orquídeas, no podemos decir que la germinación de semillas es pobre, que no son viables o que requieran de algunos factores para su germinación"; además la viabilidad puede cambiar de año tras año en la misma especie. (Van Waes, 1986a).

La viabilidad de acuerdo a Vázquez - Yanez (1997), es la capacidad de las semillas de germinar bajo condiciones óptimas mientras que en la longevidad se distinguen dos tipos: la ecológica, que es la duración de vida promedio de las semillas bajo condiciones naturales y la potencial, es la duración de la vida promedio de las semillas bajo condiciones óptimas de almacenamiento en un medio controlado (Vázquez - Yanez, 1997).

La viabilidad de todo tipo de semillas es una medida importante de la calidad de la semilla y es determinada por varias pruebas como:

- ✦ Prueba de corte: como el nombre lo indica, se cortan semillas intactas mostrando el embrión desarrollado, si existe este (Hartmann, 1988).

- ✦ Uso de Respirómetros: son complicados y frecuentemente no dan resultado (Vázquez - Yanez, 1997).

- ✦ Empleo de Rayos X: las fotografías con rayos X normalmente no miden la viabilidad pero proveen un examen de la estructura interna, pudiéndose observar daño mecánico, ausencia del embrión, infección de insectos; básicamente sólo es útil para verificar la cantidad de semillas dañadas o parasitadas de una muestra (Hartmann, 1997; Vázquez - Yanez, 1997).

- ✦ Prueba de flotación: las semillas se colocan en un recipiente con bastante agua, muchas veces las semillas flotan porque tienen un embrión muerto o un desarrollo pobre mientras que las semillas con embrión completo y denso endospermo se sumergen. Esta prueba no es siempre efectiva ya que las semillas pequeñas tienden a flotar debido a la tensión superficial o las que tienen forma de "ala" o "cola" muchas veces no se sumerge aun siendo viables (Hartmann, 1988; Vázquez - Yanez, 1997).

- ✦ Prueba con embriones separados: se emplea principalmente para muchas especies de plantas que tienen condiciones de profunda latencia y no responden a la prueba de germinación. No obstante; si el embrión es cuidadosamente cortado de la semilla y colocado en papel húmedo en una caja petri, los embriones viables pueden presentar, alguna actividad (coloración verde y separación de los cotiledones) como indicaciones definitivas de vida. Los embriones no viables permanecen blancos y sucumben rápidamente a los ataques bacterianos y fúngicos (Hartmann, 1988)

- ✦ Germinación directa: las semillas son sembradas en toallas de papel húmedo, papel filtro húmedo o en medio de cultivo y se cuentan las semillas que germinaron. Esta prueba es

lenta y de mucho tiempo (varios días, semanas o meses) da una idea confiable de la capacidad de germinación únicamente cuando las condiciones son las óptimas (Hartmann, 1997; Vázquez - Yanez, 1997).

✦ Diacetato de fluoresceína (FDA por sus siglas en inglés): El diacetato de fluoresceína es un éster de ácido graso no fluorescente de fluoresceína. El FDA entra libremente en las células vivas, en donde, rápidamente puede ser hidrolizado por enzimas esterasas, para dar fluoresceína. En las células que poseen una membrana plasmática intacta, la proporción de salida de la fluoresceína, una molécula polar, es más baja que la proporción de entrada del FDA. Así en cierto período de tiempo, la fluoresceína se acumula en dichas células conforme se incrementa la fluorescencia. Por lo tanto, la acumulación de la fluoresceína en una célula puede ser considerada como indicativo de la presencia de esterasas activas y la presencia de membranas plasmáticas intactas.

Este método se emplea principalmente para detectar viabilidad en células animales y en granos de polen, aunque también ha sido aplicada a semillas de orquídeas, como es el caso de *Dactylorhiza fuchsii*, *Ophrys apifera*, *Orchis mascula*, *Orchis mario*, *Orchis sancta* y *Serapias vomeracea*, pero ha sido necesario aplicar una incubación de 16 horas en agua y un rompimiento mecánico de la testa para que el FDA entre en contacto con el embrión (Bhojwani, 1992; Gahan, 1984; Pritchard, 1985; Widholm, 1972).

✦ Prueba de Cloruro 2,3,5-Trifeniltetrazolio (TTC por sus siglas en inglés): las semillas se remojan en una solución de TTC tornándose rojas cuando son viables. Los resultados son usualmente obtenidos en un periodo de 24 a 48 horas (Gahan, 1984; Van Waes y Debergh, 1986^a).

De los métodos mencionados, TTC y FDA han resultado ser las pruebas más favorables para determinar la viabilidad en orquídeas, pero han tenido que ser adecuadas a las características de las semillas.

El procedimiento con TTC fue desarrollado por Läkon (1949), es el ensayo bioquímico más ampliamente empleado para la evaluación de viabilidad de semillas en general. Esta prueba se basa en la reducción del TTC por las deshidrogenasas presentes en el tejido vivo a formazan el cual es rojo e insoluble en agua (figura 2). La actividad de esos sistemas enzimáticos decrece

paralelamente con la viabilidad de las semillas; por lo tanto, una coloración rojo intensa es indicadora de la presencia de células vivas del embrión. En cambio, la no coloración o la coloración rosa pálido son indicativos de la muerte o poca viabilidad de las células embrionarias. Dicha reacción ocurre dentro de las células y dado que el pigmento rojo que se forma es insoluble, no hay difusión del color rojo a otras células; por lo tanto, las zonas viables que toman color rojizo, se delimitan de las zonas muertas que mantienen su color original (Moreno, 1984; Lewis, 1988, López, 1998).

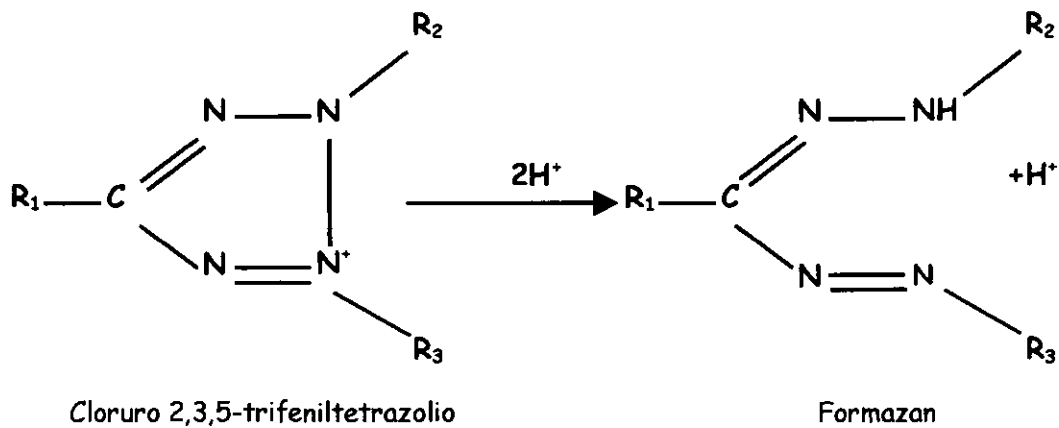


Fig 2.- Reacción del de Cloruro 2,3,5-Trifeniltetrazolio (Lewis, 1988).

Algunas ventajas de ésta prueba son:

- La detección de semillas débiles, puede ser evidente antes de la prueba de germinación.
- Es rápida, sencilla y económica.
- No se necesita de equipo sofisticado.
- Fácil interpretación.

Algunas limitaciones son:

- La prueba no refleja la latencia de la semilla.
- Los resultados no reflejan contaminación por hongos.

La prueba esta basada en la actividad de deshidrogenasas, no indica ninguna relación con la actividad de otras enzimas, las cuales pueden ser esenciales para la germinación. Si estas enzimas están inactivas pueden prevenir la germinación a pesar de tener una respuesta positiva con la prueba de TTC (Lauzer, 1994).

Esta prueba ha sido exitosamente empleada para un gran número de orquídeas epífitas tropicales y para varias especies terrestres, como: *Brassavola digbyana*, *Brassavola nodosa*, *Cattleya aurantiaca*, *Cuitlauzina pendula*, *Cyrtopodium punctatum*, *Schomburgkia tibicinis*, *Laelia flava*, *Laelia lobata*, *Laelia purpurata*, por mencionar algunas. No obstante que la prueba con TTC es aplicable a orquídeas, ha sido necesario realizar algunas modificaciones a la técnica, como es la aplicación de un tratamiento previo a la prueba, ya que la permeabilidad de la testa de las semillas varía considerablemente, se puede emplear $\text{Ca}(\text{OCl})_2$, NaOCl , agua destilada, etc.: para mejorar la eficiencia de la prueba (Shoushtari, 1994; Van Waes y Debergh, 1986a).

La viabilidad tomada como la capacidad de sobrevivencia del embrión de una semilla, ha sido estudiada en un número de especies vegetales, pudiéndose reconocer semillas de viabilidad corta o de viabilidad larga, algunas pueden perder su viabilidad dentro de 9 meses, 2 meses o menos, pero otras pueden permanecer viables por largos periodos (hasta 18 años) si se secan y se almacenan en un desecador y refrigeran a 0, 4 o 10 °C. Sin embargo, la mayoría perderá su viabilidad si se guardan a temperatura ambiente (21 - 22 °C) (Pierik, 1990; Arditti, 1967).

La información reunida para las especies mexicanas es escasa, algunos trabajos han involucrado especies que se distribuyen en México sin ser motivo de los mismos. Otro como el de Flores (com. pers. 2001) ofrece los primeros datos sobre viabilidad de 20 especies de orquídeas mexicanas provenientes de varios tipos de vegetación, con aplicaciones prácticas para su almacenamiento. No obstante hace falta esa información para las cerca de 1200 especies que habitan en el país y cobra importancia en el manejo de estas y otras plantas en bancos de recursos fitogenéticos como el que se planea en el presente en la Unidad de Biología y Prototipos (UBIPRO) de la FES Iztacala en combinación con el Banco de Germoplasma de la Universidad de Chapingo y el Banco de semillas de Kew, Inglaterra, para las zonas áridas y semiáridas de México. Estudios como los realizados en *Cattleya aurantiaca*, una especie de amplia distribución en Mesoamérica, que han involucrado varios años y autores son ideales, pero en el caso de esta especie obedecen a su importancia hortícola en programas de hibridación y a su carácter frecuentemente cleistógamo, lo que facilita disponer de abundante semilla que, facilita a su vez, la realización de estudios cuantitativos muy confiables (Arditti y Ernest, 1993; Seaton y Hailes, 1989; Shoushtari, 1994; Soto, 1990).

2. Valle de Tehuacán, Puebla.

La tierra árida y semiárida comprende la zona ecológica más extensa con un área de casi la mitad del territorio nacional. En la zona centro de la República Mexicana, al sur del trópico de Cáncer, entre los 17°32'34"N y 18°52'46"N y los 96°18'14" W y 97°50'30" W, formando parte de los estados de Oaxaca y Puebla se localiza la reserva de la Biosfera Tehuacán - Cuicatlán, la cual tienen una superficie de 490 186 Ha y esta conformada por 20 municipios del estado de Puebla y 31 municipios del estado de Oaxaca (Instituto Nacional de Ecología, 1998; Rzedowski, 1988; Rzedowski, 1993).

Se calcula en el Valle de Tehuacán, alberga 2703 especies de vegetales repartidas en 189 familias. Con estas características puede definirse una de las regiones más ricas en biodiversidad de México. Numerosas especies se distribuyen en áreas contiguas o bien son endemismos del Valle, razones por las que el área ha sido decretada Reserva de la Biosfera. Habiéndose integrado hasta fechas recientes inventarios florísticos muy completos (Dávila, et al. 1993), que incorporan especies nuevas, apenas descritas después de una larga historia de inaccesibilidad y dificultades para la colecta, resulta evidente que la biología de la mayoría de las especies es poco menos que desconocida, lo que justifica todo esfuerzo por integrar información de la misma. Dentro de este marco de referencia, el manejo de semillas de cualquiera de las especies con fines de conservación se vuelve necesario, particularmente en los casos de especies raras ó de alguna forma amenazadas, ya que la historia de presencia humana en el Valle data de mucho tiempo atrás y se pueden localizar, muchas zonas alteradas en forma antigua ó reciente. Entre las especies presentes está la de las orquídeas representadas por poco más de 60 especies, la mitad de las cuales se localiza en la contigua Cuenca de Río Hondo al SO de Tehuacán significándose como una de las familias mejor representadas de ese territorio (Dávila et al., 1993; Tenorio, 1997).

El Valle de Tehuacán Cuicatlán es una región semiárida, debido a la sombra de lluvia producida por la Sierra Madre Oriental, que localmente es conocida como Sierra de Zongolica producto de las características físicas de la atmósfera y de la posición del Valle con respecto a la circulación atmosférica. De acuerdo a la clasificación de Köppen modificada por García corresponde a $Bs_0hw(w)(e)g$, que es un clima seco con régimen de lluvia en verano. La

precipitación media anual de la zona es de 380 mm, con una temperatura media anual de 21°C (Cortes, 1997).

El número de especies de orquídeas resulta importante en comparación con otras regiones asumiendo que su presencia y abundancia están ligadas en muchos casos, más a valores altos de precipitación que a otros factores climáticos. Toda información sobre su viabilidad y germinación se desconoce y su presencia sugiere adaptaciones importantes a las condiciones de aridez. (Dávila, et. al., 1993).

Las orquídeas se distribuyen en México en muy diferentes regiones y tipos de vegetación; el número de especies se calcula en cerca de 1200 comprendidas todas sus formas de vida y los tipos de vegetación más ricos en ellas en relación con su carácter fuertemente epífita son el bosque mesófilo de montaña, el bosque tropical perennifolio y el bosque de encino, en ese orden respectivamente (Soto, 1990). En el Valle de Tehuacán las formas de vida predominantes son la terrestre y litofítica desplazando fuertemente esta última a la forma de vida epífita (Aguirre en preparación). Las áreas donde pueden encontrarse dentro de la región de estudio son valles, mesetas y cañones. La región de estudio corresponde al Valle de Zapotitlán y alrededores.

El Valle de Zapotitlán se localiza en la porción occidental del Valle de Tehuacán - Cuicatlán, este valle se encuentra incluido en la reserva de la Biosfera con una superficie aproximada dentro de la reserva de 44, 446.25 Ha. Al Noreste limita con el Valle de Tehuacán y al Sur con la región de la alta Mixteca. Fisiográficamente pertenece al área denominada Mixteca Oaxaqueña, mostrando un relieve montañoso, aunque el declive no es abrupto hasta el Norte (INE-SEMARNAP, 1997)

3. Descripción de las especies de estudio.

a) *Encyclia hanburii*.

Esta especie es muy atractiva puede ser distinguida por la cierta inclinación de la columna, los lóbulos laterales del labio están ensanchado cerca del ápice, bastante terso. . Los pseudobulbos están en grupos y de forma ovoide, cada uno con un par de hojas apicales delgadas y gruesas de 25 cms de ancho. El tallo de las flores apicales y las inflorescencias, son simples o ramificadas, con 12 o más flores, de 50 - 60 cms de longitud. Se encuentra solamente en México, ha sido colectada a 1200 - 1800 metros de altitud en Chiapas, Guerrero, Oaxaca y Puebla, crecen en encinos secos, y algunas veces en rocas. Florece de Abril a Julio (Dessler, 1976, Wiard, 1987). En el área de estudio crece sobre rocas en los cerros El Cutac y próximas a Barranca El Castillo.



Fig 3.- *Encyclia hanburii*.

b) *Laelia albida*

Las plantas casi siempre son epífitas y se reconocen por los pseudobulbos ovoides a veces alargados, rizoma corto y 1 a 3 hojas lineares, acuminadas, arqueadas, de hasta 20 cm de largo y 1,8 cm de ancho. La inflorescencia de 20 a 60 cm de largo, con un racimo de 5 a 12 flores en la parte terminal, cada flor con un diámetro de 2.5 a 4.5 cm, con fuerte fragancia a miel. Los pétalos y sépalos son blancos, blanquecinos o crema, el labelo rosado pálido hasta rosado fuerte; en el centro se distinguen 3 quillas paralelas de color amarillo y garganta del labelo tienen rayas bifurcadas rojo-púrpuras. La textura de las flores es fuerte y duran abiertas en la planta de 10 a 15 días.

Las plantas crecen sobre árboles, preferentemente sobre encinos, pero incluso sobre yucas; también sobre rocas, en altitudes de 1400 a 2300 m, en bosques mixtos de pino, encino y enebro, abiertos, secos y caducifolios. Ocasionalmente se encuentran plantas de gran tamaño.

Laelia albida habita un territorio sumamente extenso, ya que se ha encontrado en Sinaloa, Durango, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Puebla (Halbinger, 1993; Tenorio, 1997).

Se trata de una planta vistosa, escasa dentro del Valle de Tehuacán, los lugareños la conocen como "monjita blanca", antiguamente la flor se empleaba como desinflamante de oídos y los pseudobulbos como alimento, actualmente tiene uso ceremonial, de ornato, además de ser silvestre-transplantado-fomentado, crece sobre rocas, *Beaucarnea gracilis*, *Quercus sp* y además de cultivarse sobre mezquites y otros árboles. Dentro del área de estudio se encuentra de manera natural en los Cerros Campanario, Ometepepec, La Yerba, Gordo y de forma cultivada en los poblados San Martín, San Juan, Raya, Plan de San Miguel, Los Reyes Metzontla y Agua Mezquite (Santos, comp. pers. , 2001).



Fig 4.- *Laelia albida*.

c) *Oncidium brachyandrum*

Oncidium brachyandrum crece frecuentemente epífita, sobre encinos, florece en primavera, del pseudobulbo del año anterior, la inflorescencia, es sencilla, de corta duración, con dos a seis flores únicamente. Las flores son amarillas con café (Hágsater, 1975; McVaugh R., 1985). En Tehuacán crece sobre rocas, en cerros al sureste de Zapotitlán (Cerro Gavilán entre

otros) y es una especie escasa.

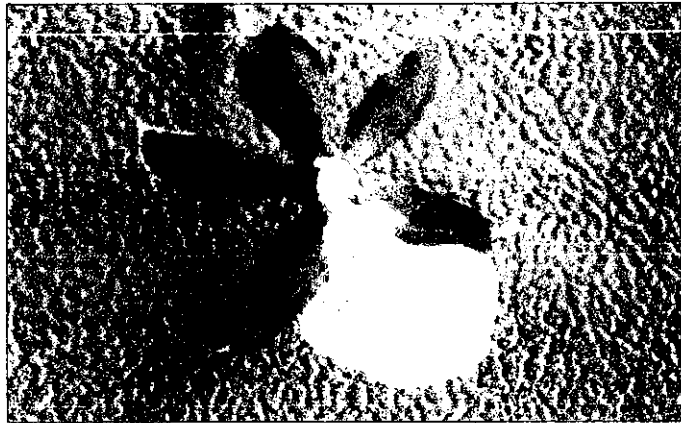


Fig 4.- *Oncidium brachyandrum*.

Como se ha mencionado, las orquídeas mantienen un equilibrio preciso con su ambiente, sin embargo, la alteración de su medio, propiciada principalmente por la acción del hombre, provoca la destrucción de éstas y otras plantas silvestres. No se puede esperar conservar todos los hábitats de orquídeas, pero existen opciones como es la posibilidad de almacenar semillas como una forma de preservar el germoplasma.

En general, las semillas son por lo común fáciles de recolectarse, transportar, almacenar, distribuir y germinar, sin embargo, cada vez resulta más claro que esta forma de conservación no puede ser aplicada a todas las especies y que existen problemas básicos de investigación que requieren solución para que el almacenamiento de semillas pueda realizarse.

Por lo tanto, debido a la necesidad cada vez mayor de preservar la diversidad biótica de México, es necesario ampliar y profundizar en el conocimiento de el almacenamiento de las semillas de orquídeas viables por tiempo prolongado, de aquí que el presente trabajo pretenda aportar información útil para el manejo de las especies elegidas con fines de conservación.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- * Aportar información experimental sobre la viabilidad de semillas almacenadas de tres especies de orquídeas del Valle de Tehuacán, Puebla con fines de conservación.

Objetivos particulares:

- * Probar la utilidad de la prueba de Cloruro de 2,3,5 - Trifeniltetrazolio en la determinación periódica de viabilidad de cada especie con respecto a la prueba de diacetato de fluoresceína.
- * Determinar periódicamente el porcentaje de germinación de las semillas de las tres especies durante su almacenamiento a 4°C con CaCl_2 .
- * Correlacionar los porcentajes de viabilidad y de germinación obtenidos de cada especie de orquídea.

METODOLOGIA

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Unidad de Biotecnología y Prototipos durante Enero de 1999 a Diciembre del 2000.

Se emplearon semillas maduras obtenidas de frutos secos de *Encyclia hanburii*, *Laelia albida* y *Oncidium brachyandrum*, del Valle de Tehuacán, Puebla.

I. - Colecta de las semillas.

Las semillas fueron obtenidas de plantas localizadas en el Valle de Zapotitlán, dada la escasez natural de los frutos (cápsulas), sólo se empleó una cápsula dehiscente de cada una de las especies.

Sin embargo, tomando en cuenta que cada fruto contiene varios miles de semillas, se consideraron suficientes para cubrir los objetivos.

II. - Almacenamiento de las semillas.

Las semillas se retiraron de la cápsula madura respectivamente y fueron almacenadas en bolsas de papel, sobre cloruro de calcio (CaCl_2) a 4°C (Davis, 1946; Shoushtari, 1994; Seaton, 1989; Thompson, 1974).

Se determinó peso, viabilidad y germinación de las semillas mensualmente durante un periodo de 8 meses.

III. - Peso de las semillas.

Para determinar el peso individual de las semillas se pesó 1 mg de semillas de cada especie, se contó el número de semillas y se dividió entre 1000 obteniéndose el peso de la semilla en μg , la determinación de peso se relaciona con el contenido de humedad en las semillas (Shoushtari, 1994).

IV.- Prueba de viabilidad con Cloruro 2,3,5-Trifeniltetrazolio (TTC).

Para optimizar el método de TTC, se aplicaron pretratamientos que se presentan en la tabla 2, de acuerdo a los hallazgos de Van Waes y Debergh (1986a), los pretratamientos fueron removidos con una pipeta Pasteur y las semillas fueron lavadas 3 veces en agua destilada estéril, posteriormente se procedió a la incubación con TTC.

Las semillas fueron colocadas en pequeños viales con 3 ml de la solución de TTC. Los viales cerrados se mantuvieron en oscuridad a 30 ± 2 °C. Durante 24, 48, 72 y 96 hrs. El procedimiento anteriormente descrito se conoce como el "método clásico".

Pretratamiento	Tiempo de Incubación.
Agua destilada	1 hr
Agua destilada.	24 hr
*Hipoclorito de sodio (NaOCl) 2.5%	1 hr
*Hipoclorito de sodio (NaOCl) 2.5%	24 hr
*Hipoclorito de sodio (NaOCl) 5%	1 hr
*Hipoclorito de sodio (NaOCl) 5%	24 hr
*Hipoclorito de sodio (NaOCl) 10%	1 hr
*Hipoclorito de sodio (NaOCl) 10%	24 hr
*Hipoclorito de sodio (NaOCl) 15%	1 hr
*Hipoclorito de sodio (NaOCl) 15%	24 hr
Hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) 5% + 1% Tween 80	1 hr
Hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) 5% + 1% Tween 80	24 hr

Tabla 2.- Pretratamientos que se aplicaron a las semillas de las tres especies de orquídeas estudiadas, * las concentraciones del hipoclorito de sodio son a partir del cloro comercial.

Las semillas se observaron al microscopio óptico para registrar la tinción de los embriones.

Las semillas fueron divididas en tres categorías de acuerdo al del embrión:

1. Embrión completamente coloreado de rojo o rojizo, (semillas viables).
2. Embrión amarillo o blanco (semillas no viables).
3. Semillas sin embrión.

Se contaron 100 semillas realizando 10 repeticiones por pretratamiento para cada especie de orquídea.

V. - Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos fueron a analizados un análisis de varianza factorial(ANAVA) y la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) con el programa Statistic 6/W, para determinar el pretratamiento más adecuado para cada especie de orquídea, el cual se continuó aplicando por 8 meses consecutivos para determinar la viabilidad de las semillas, además se determinó duración mínima, duración óptima y duración máxima del pretratamiento (Van Waes y Debergh, 1986a; Van Waes y Debergh, 1986b).

VI. Prueba de viabilidad con diacetato de fluoresceína (FDA).

Las semillas fueron colocadas en agua destilada por 16 horas a temperatura ambiente, posteriormente, se mezclaron la suspensión con las semillas y el FDA en proporción 1:1; para permitir que el FDA tuviera contacto con el embrión, se colocó una gota de la mezcla anterior en un portaobjeto y se colocó un cubreobjeto, con cuidado se giro ligeramente en direcciones opuestas para la ruptura de la testa. Después de 10 minutos, se observaron bajo un microscopio de fluorescencia Zeizz West Germany, la lectura se realizó utilizando la longitud de onda de 400 - 440 y los filtros FT460, LP470. Se consideraron como semillas viables las que presentaron una coloración verde brillante, las no viables no presentaron fluorescencia, se contaron 100 semillas realizando 10 repeticiones por cada especie de orquídea, los resultados obtenidos junto con los de TTC se analizaron por medio de la Prueba de t de Student (Pollard, 1990; Pritchard, 1985; Widholm, 1972).

VII. - Germinación.

Las semillas de *Encyclia hanburii*, *Laelia albida* y *Oncidium brachyandrum*, fueron sembradas en dos medios de cultivo, K4003 y K4128 (Sigma), que son modificaciones comerciales del medio Knudson C (KC, que en lo sucesivo denominaremos KC4003 y KC4128) habitualmente empleando en la germinación de semillas de muchas orquídeas (Thompson, 1977), y al que se agregaron dos agentes gelificantes (agar 7 g/L y gelrite 2.5 g/L) en cada caso.

La siembra fue de acuerdo al siguiente procedimiento:

- 1.- Se colocaron las semillas en una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 20 minutos.
- 2.- Se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril para eliminar el exceso del desinfectante, a partir de ese momento las semillas se manejaron en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.
- 3.- Con un pincel estéril se tomó una muestra de las semillas y se esparcieron en la superficie del medio de cultivo, contenido en una caja petri.

Una vez terminada la siembra las cajas petri fueron incubadas a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo de 16 hrs luz, proporcionado por lámparas fluorescentes blancas con una radiación de $12 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$, la radiación fue determinada con un radiómetro Hansatech.

Se realizaron 10 repeticiones utilizando 100 semillas cada una por cada medio de cultivo y sus gelificantes, los resultados obtenidos durante el primer mes de germinación se procesaron por la prueba de t de Student para determinar el medio y gelificante óptimo para la germinación de cada especie continuando la siembra de las semillas durante los siguientes 8 meses.

VIII.- Cuantificación de la germinación.

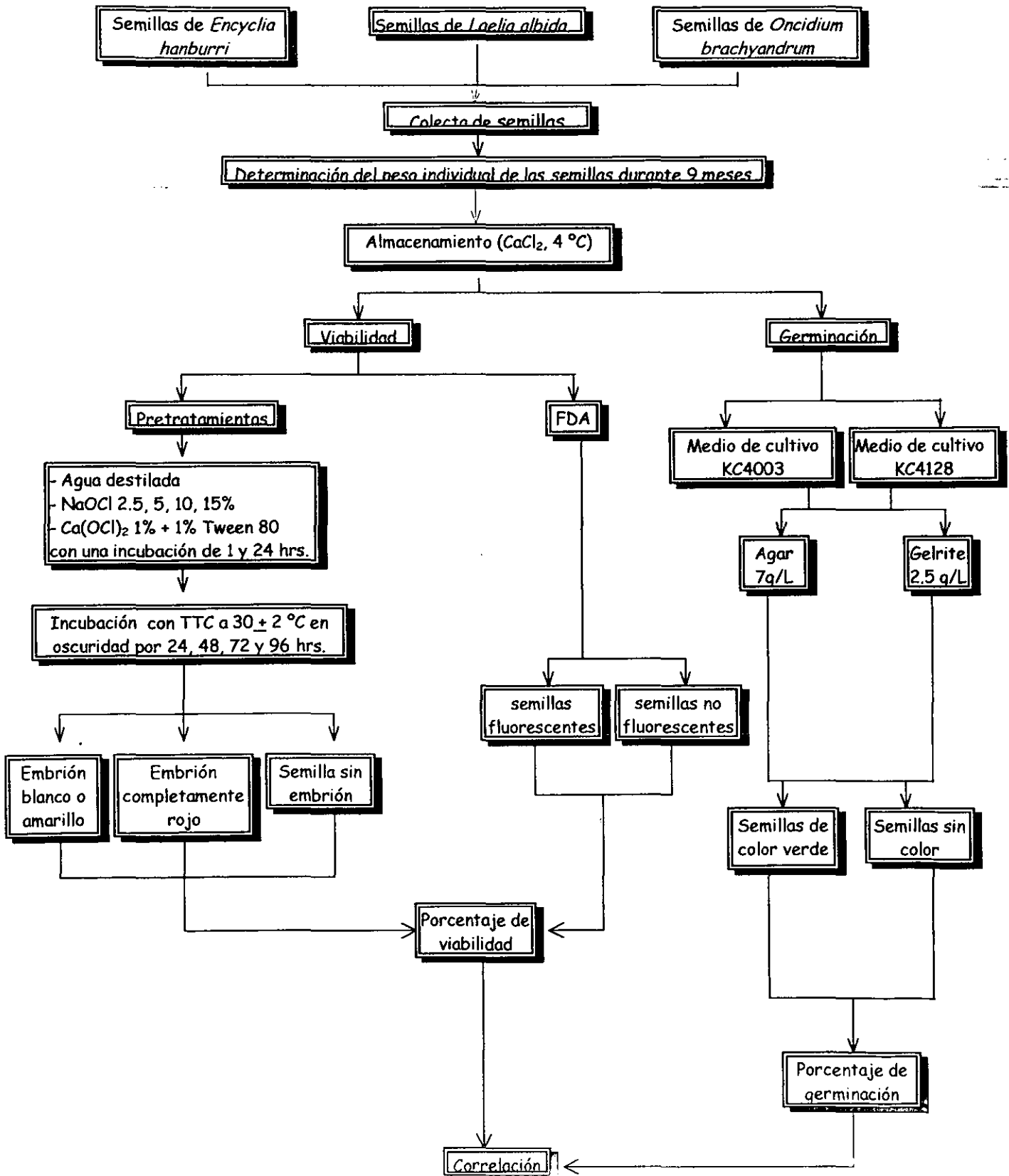
Para la cuantificación del porcentaje de germinación, se marcaron las cajas petri con líneas de 1 cm de ancho, contaron 100 semillas y de estas se contaron las que germinaron hasta obtener un total de 10 repeticiones.

Los cultivos fueron observados diariamente hasta que el embrión adquirió una coloración verde (la cual fue considerada como el primer signo de germinación). Después fueron evaluados semanalmente, hasta que las semillas germinadas presentaron raíces, los resultados se expresaron como: 1) tiempo en que el embrión se torno verde y 2) porcentaje de germinación (Seaton, 1989; Soushtari, 1994).

IX.- Correlación de viabilidad con la germinación.

La correlación entre el porcentaje de viabilidad obtenido con la prueba de TTC y el porcentaje de germinación, así como la correlación entre la viabilidad y el peso de cada una de las especies de orquídeas, fueron realizadas mediante el programa Excell de Windows 98 .

DIAGRAMA DE FLUJO



RESULTADOS

Para determinar el pretratamiento adecuado para las semillas de cada especie de orquídeas, se realizó la prueba del análisis de varianza factorial, revelando diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) para las tres variables de respuesta, (embriones rojos, embriones amarillos y semillas sin embrión), resultando el pretratamiento la interacción significativa ($P < 0.05$). Por lo tanto, para cada una de las variables se procedió a realizar la prueba de LSD de Fisher (fig. 6, 7, 8).

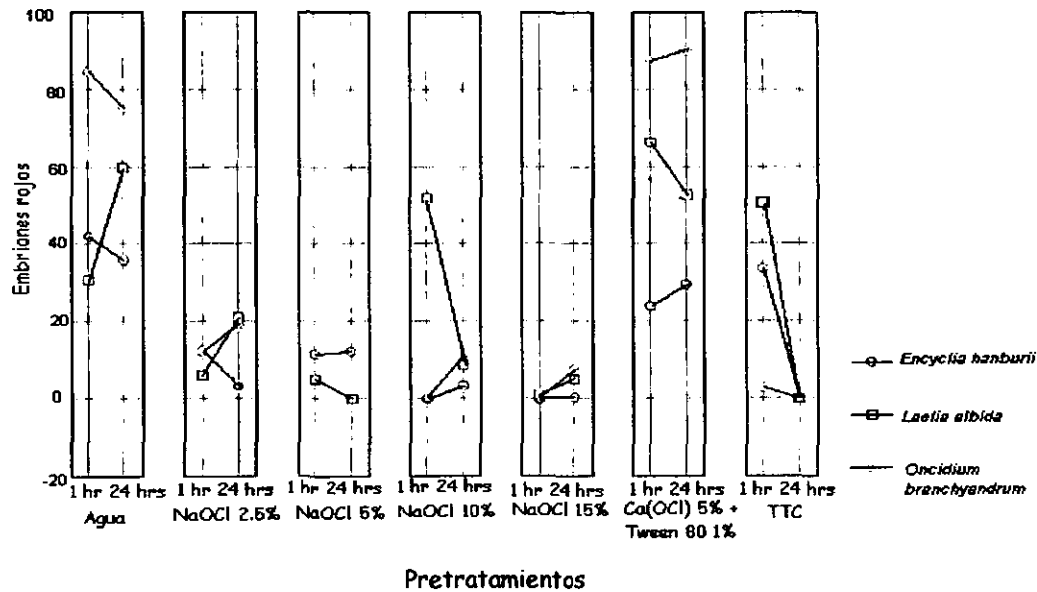
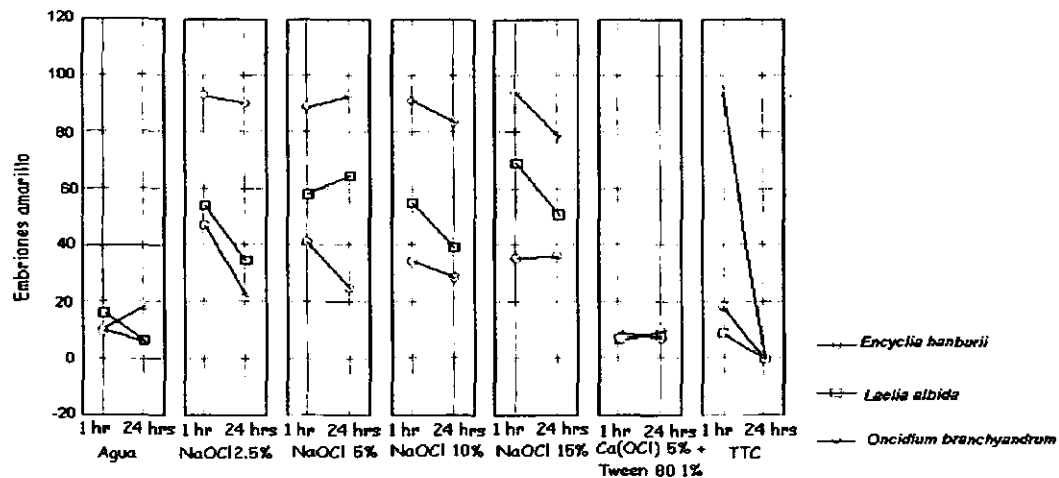
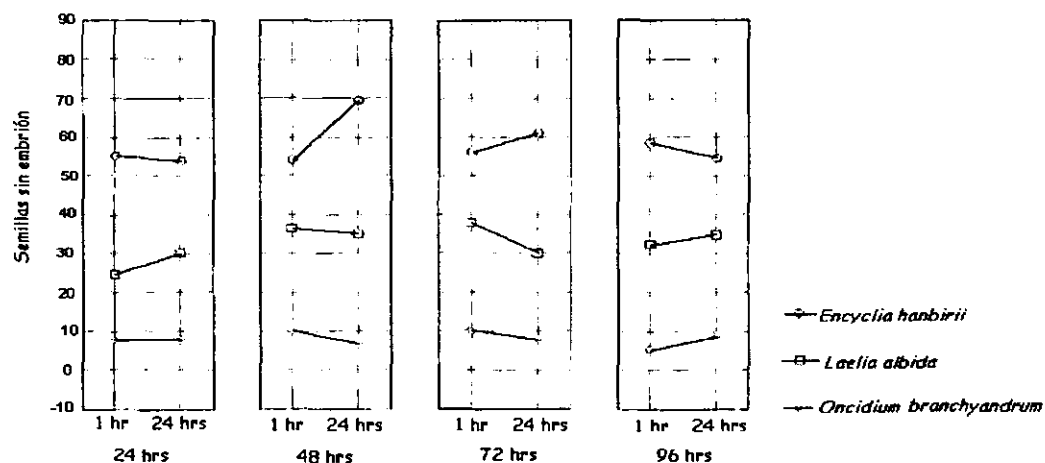


Figura 6.- Porcentaje de embriones teñidos (viables) de las 3 especies de orquídeas, resultantes de la interacción entre tiempo, pretratamientos e incubación con TTC.



Pretratamientos

Figura 7.- Porcentaje de embriones no teñidos (no viables) de las 3 especies de orquídeas, resultantes de la interacción entre tiempo, pretratamientos e incubación con TTC.



Tiempo de incubación con TTC

Figura 8.- Porcentaje de semillas sin embrión de las 3 especies de orquídeas, resultantes de la interacción entre tiempo, pretratamientos e incubación con TTC.

Encyclia hanburii

La incubación por 24 horas de las semillas en agua antes de aplicar el método clásico de TTC fue el mejor (promedio de 41.8 embriones teñidos), con un tiempo de 96 horas de incubación en TTC (figura 6, tabla 3, figura 18), mientras que el mayor número de embriones no teñidos se presentó con 24 hrs de incubación (promedio 51.60) con NaOCl al 15% después de 24 hrs de incubación con TTC (figura 7).

Se aplicó el pretratamiento de 24 horas en agua a las semillas durante los subsiguientes 8 meses de almacenamiento, observándose una disminución de la viabilidad (45.2 a 16.97) de las semillas (figura 9, figura 18), así como un aumento en el número de embriones amarillos (7.72 a 40.82) que corresponde a la pérdida de viabilidad (figura 10).

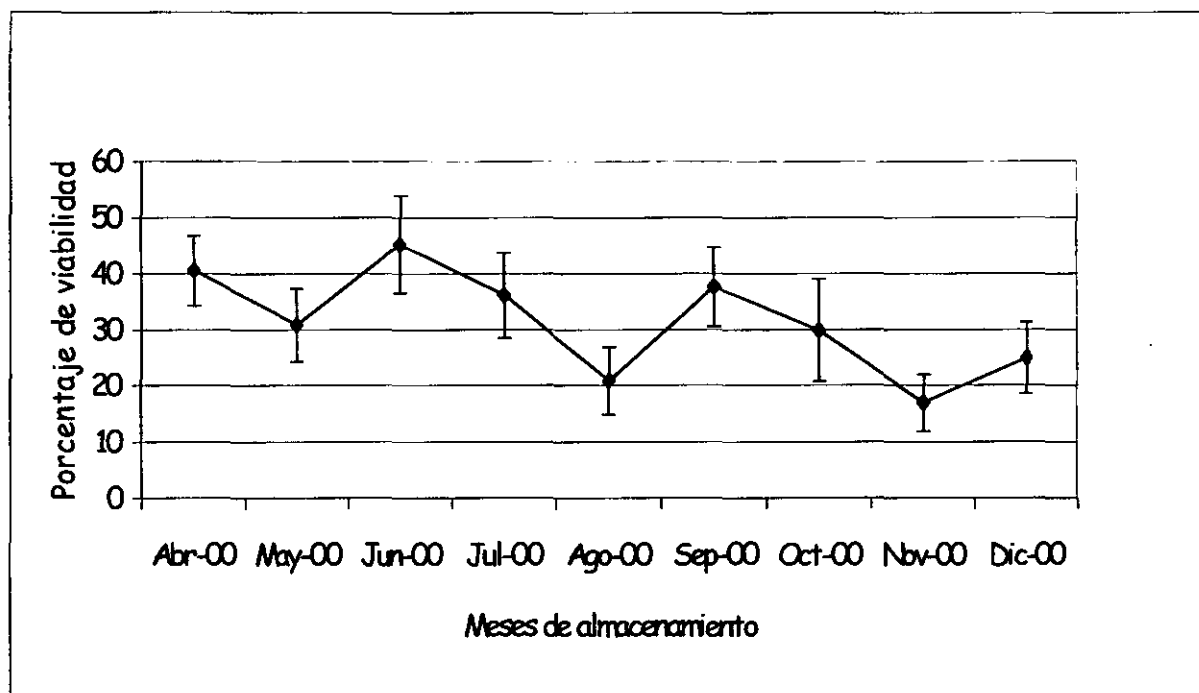


Figura 9.- Viabilidad (embriones teñidos) de *Encyclia hanburii*, durante 8 meses de almacenamiento. Los porcentajes son el promedio \pm SD de 10 repeticiones.

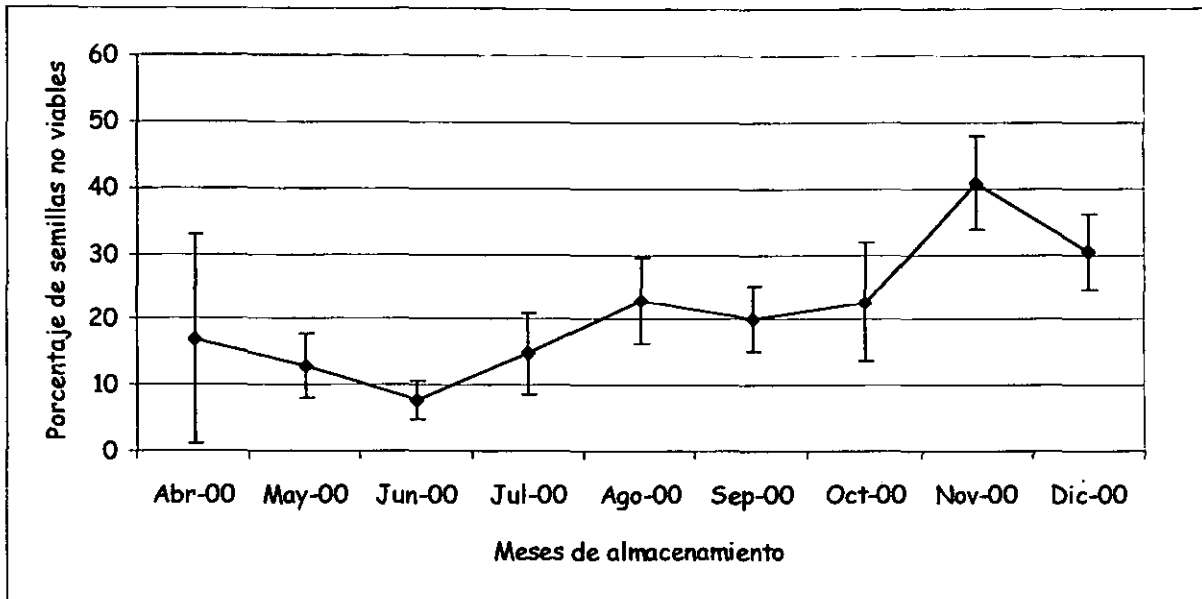


Figura 10.- Semillas no viables (embriones amarillos o blancos) de *Encyclia hanburii*, durante 8 meses de almacenamiento. Los porcentajes son el promedio \pm SD de 10 repeticiones.

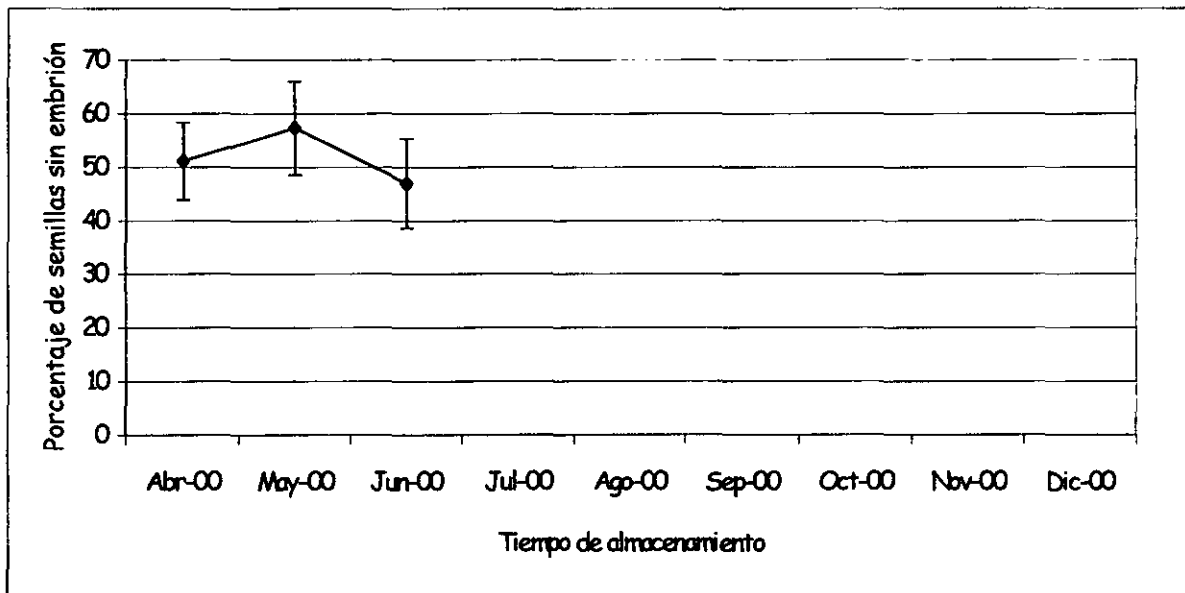


Figura 11.- Semillas sin embrión de *Encyclia hanburii*. Los porcentajes son el promedio \pm SD de 10 repeticiones.

Con respecto a la germinación, de acuerdo al análisis de varianza de dos factores ($P < 0.05$) se observaron diferencias estadísticamente significativas encontrándose que la mejor combinación fue KC4128-gelrite con un promedio de 21.2 %, siguiendo la de KC4003-agar con un promedio de 20.4% (figura 12), continuando la siembra de las semillas en ambos medio con este gelificante, se observo una disminución de la germinación (KC4128-gelrite $21.2 \pm 5.15 - 10.8 + 3.64$, KC4003-agar $20.4 \pm 4.50 - 19.7 + 4.34$) a través del tiempo en ambos gelificantes (figura 13, figura 38).

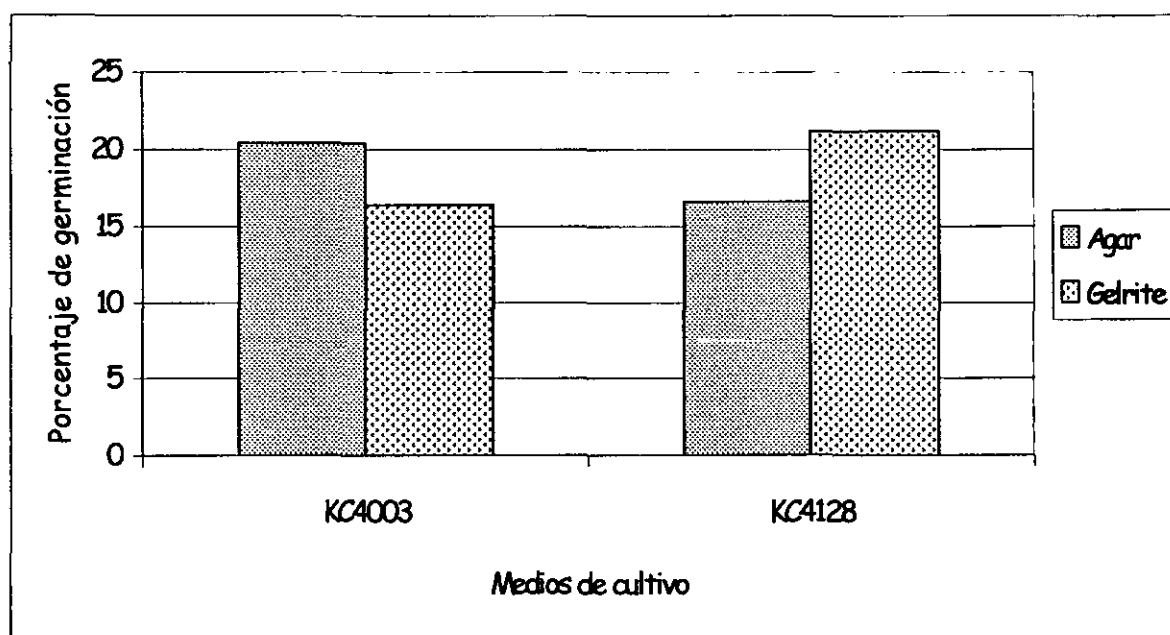


Figura 12.- Interacción entre los medios de cultivo y gelificantes en la germinación de *Encyclia hanburii*.

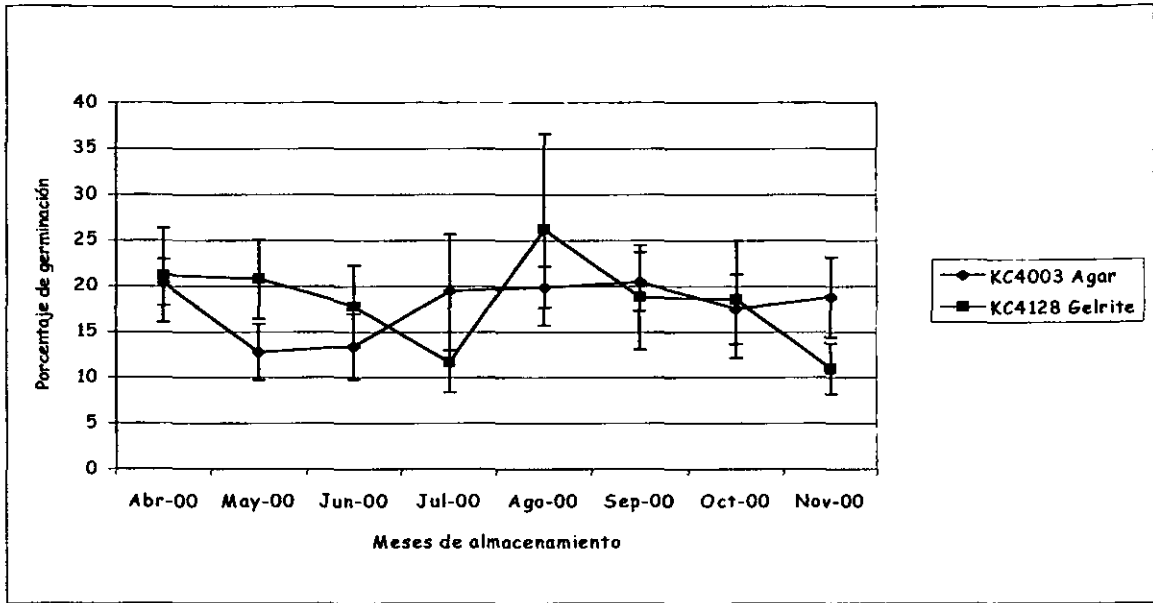


Figura 13.- Germinación de *Encyclia hanburii*, en dos medios de cultivo durante 8 meses de almacenamiento. Los porcentajes son el promedio \pm SD de 10 repeticiones.

No se observaron variaciones significativas (1.2 - 1.5 μ g), con respecto al peso durante el almacenamiento de las semillas (figura 14).

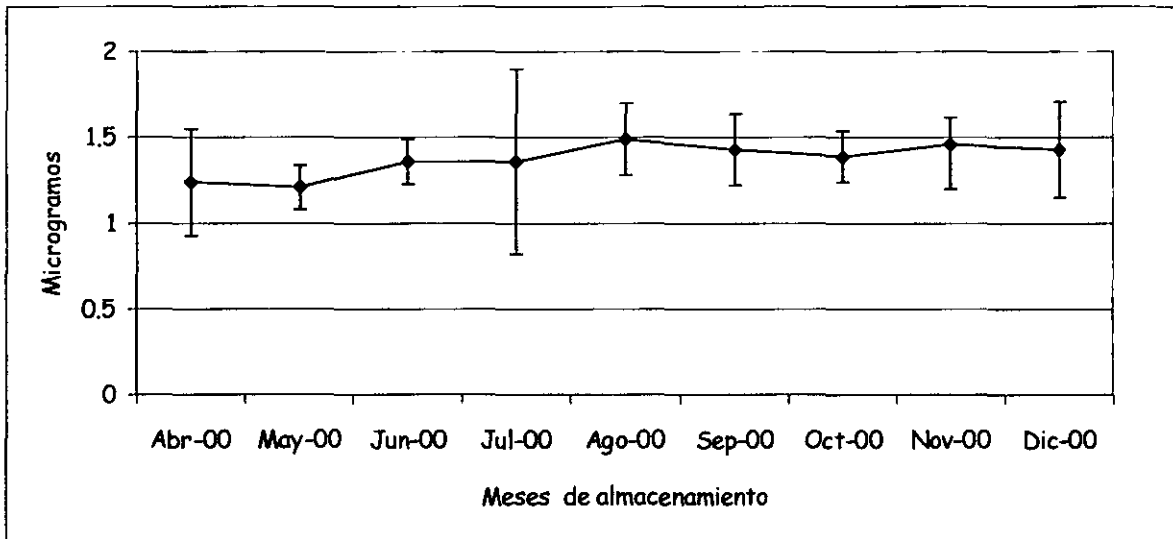


Figura 14.- Peso promedio de las semillas de *Encyclia hanburii*, durante 8 meses de almacenamiento. Los porcentajes son el promedio \pm SD de 10 repeticiones.

No se encontró una correlación ($P > 0.05$) entre la viabilidad con TTC y la germinación en el medio KC4128-gelrite (0.09), ni con el medio KC4003-agar ($r = -0.07$), (figura 15 y 16), no obstante, si la hubo ($P < 0.01$) entre la viabilidad de las semillas y el peso ($r = -0.31$, $n=90$), (figura 17). Por último, en cuanto a la prueba de t-Student hay diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.01$), entre el TTC y el FDA (figura 39, figura 40), siendo con la aplicación de este último que se obtuvieron los mejores resultados.

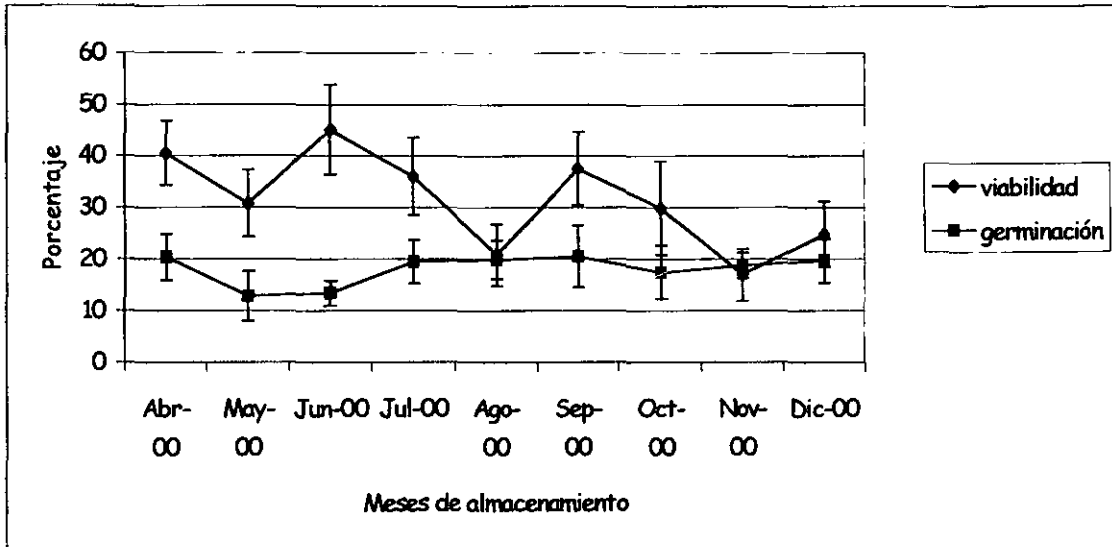


Figura 15.-Correlación entre el porcentaje de viabilidad (embriones teñidos) y el porcentaje de germinación de *Encyclia hanburii*, medio KC4003-agar, durante 8 meses de almacenamiento. Los porcentajes son el promedio \pm SD de 10 repeticiones.

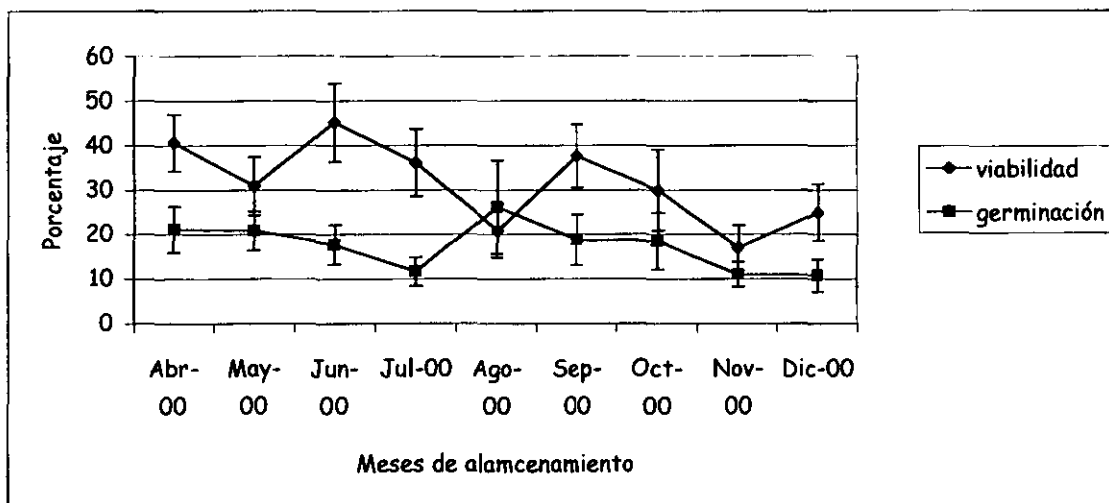


Figura 16.- Correlación entre el porcentaje de viabilidad (embriones teñidos) y el porcentaje de germinación de *Encyclia hanburii*, medio KC4128-gelrite, durante 8 meses de almacenamiento. Los porcentajes son el promedio \pm SD de 10 repeticiones.

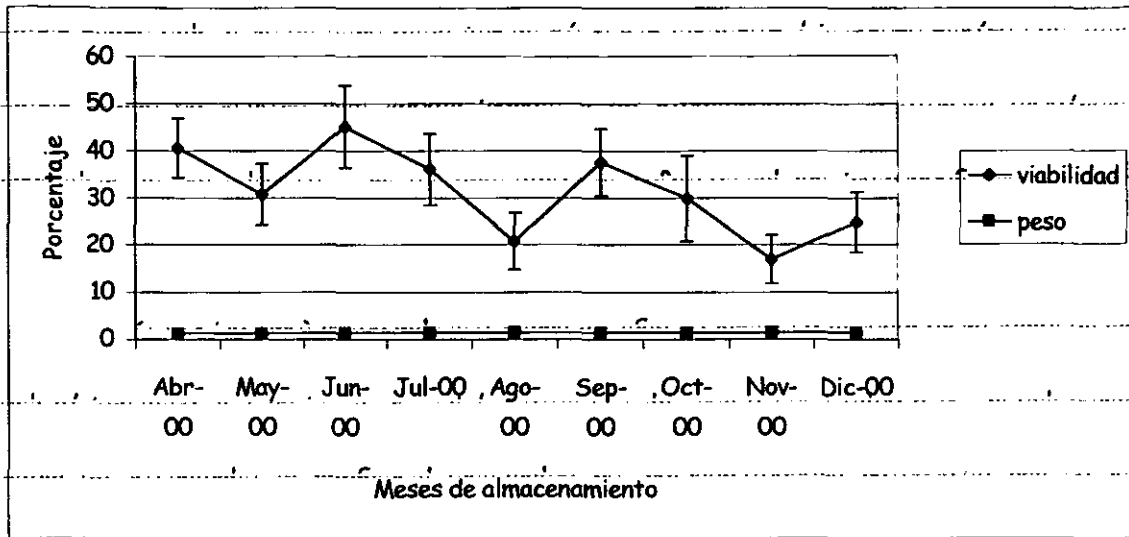


Figura 17.-Correlación entre el porcentaje de viabilidad (embriones teñidos) y peso de las semillas de *Encyclia hanburii*, durante 8 meses de almacenamiento. Los porcentajes son el promedio \pm SD de 10 repeticiones.

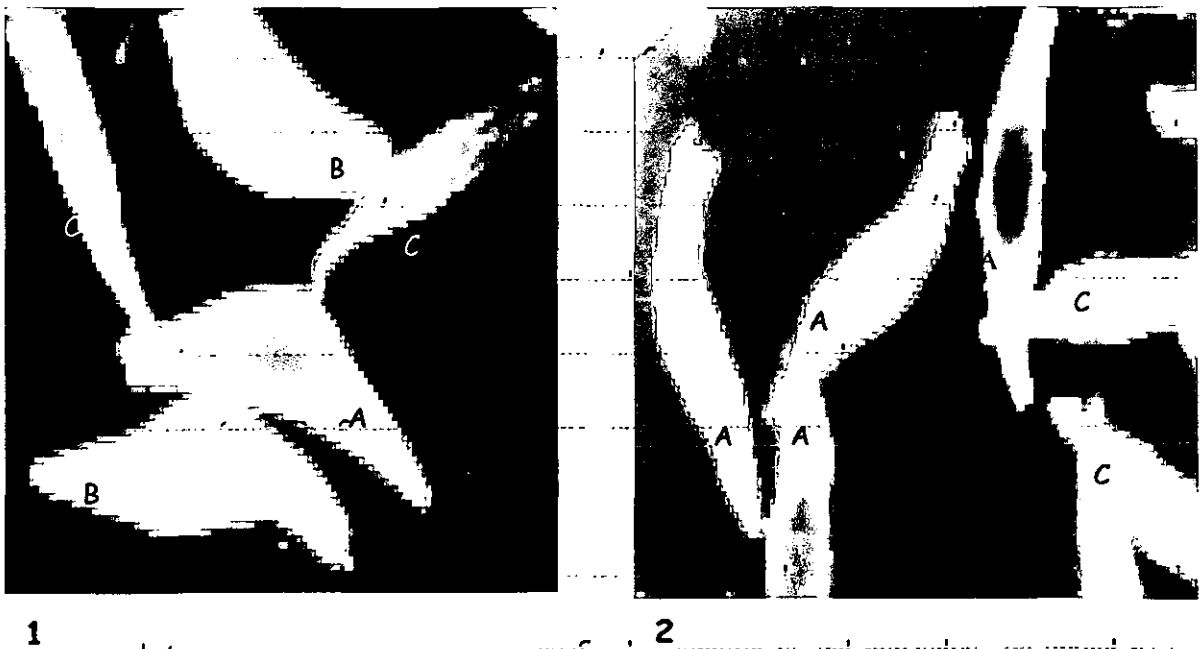


Figura 18.- Dos campos de *Encyclia hanburii* tratadas con agua destilada durante 24 hrs, posteriormente se incubaron con TTC durante 96 hrs. (A) semillas viables, (B) semillas no viables y (C) semillas sin embrión.

Laelia albida

En el caso de *Laelia albida*, el mayor rendimiento de embriones rojos (promedio 71.60) fue para el pretratamiento de 24 horas de incubación con $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 5% + 1% Tween 80, seguido de 72 horas con TTC (figura 6, tabla 3, figura 27), y el mayor número de embriones sin teñir (promedio 51.60), se obtuvo después de 24 horas de incubación en NaOCl 15% seguido de 24 hrs en TTC (figura 7). Se continuó la incubación de las semillas en $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 5% + 1% Tween 80 para determinar la viabilidad de estas durante el tiempo de almacenamiento, observándose una disminución drástica (64 a 14.5) de la viabilidad (figura 19), así como un incremento en el número de embriones amarillos (13.7 a 38.62), (figura 20).

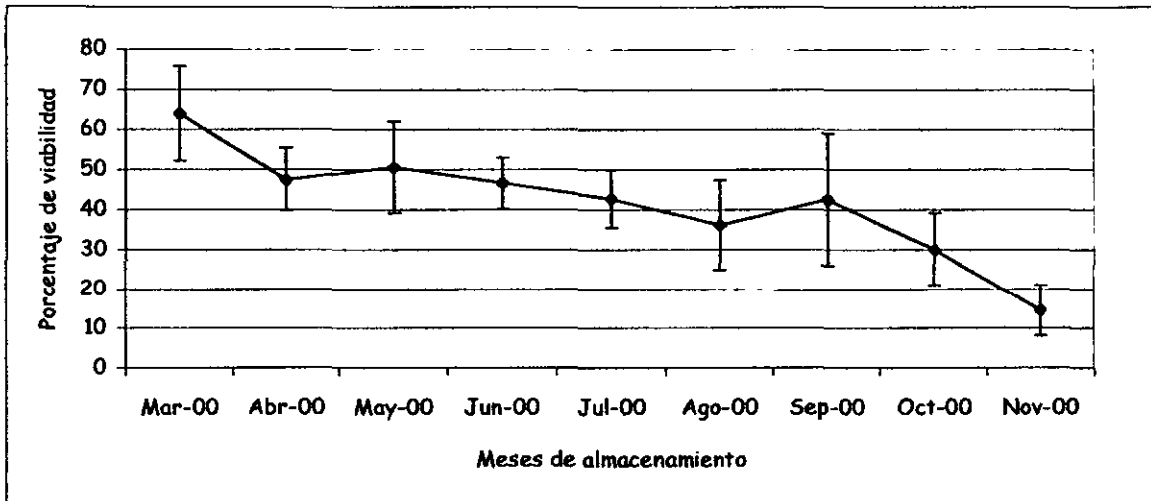


Figura 19.- Viabilidad (embriones teñidos) de *Laelia albida*, durante 8 meses de almacenamiento. Los porcentajes son el promedio \pm SD de 10 repeticiones.

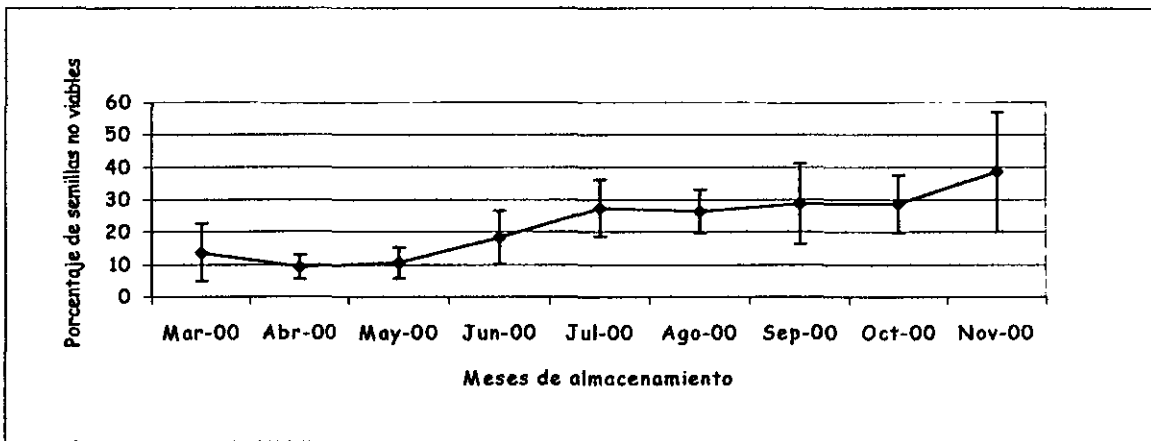


Figura 20.- Semillas no viables (embriones amarillos o blancos) de *Laelia albida*, durante 8 meses de almacenamiento. Los porcentajes son el promedio \pm SD de 10 repeticiones.

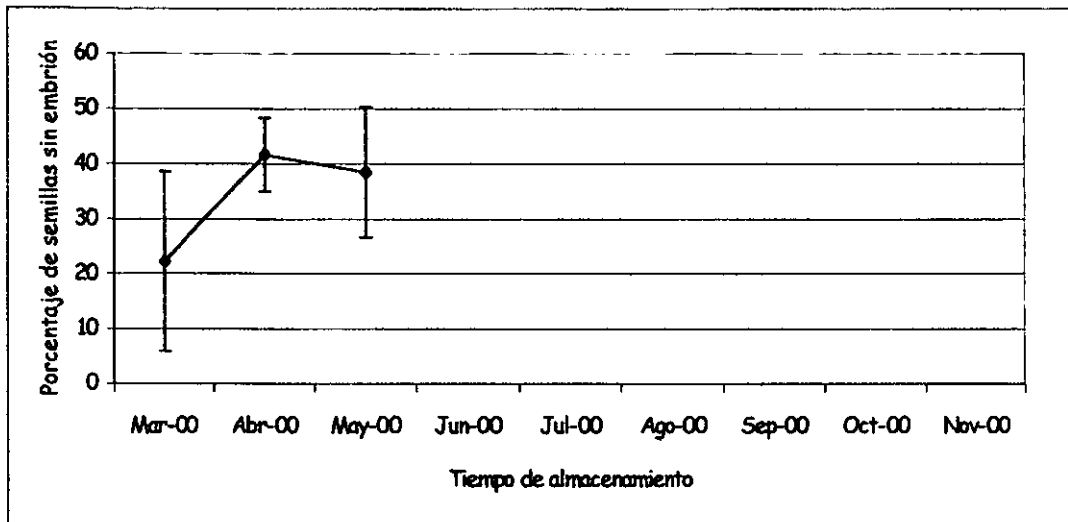


Figura 21.- Semillas sin embrión de *Laelia albida*.. Los porcentajes son el promedio \pm SD de 10 repeticiones.

Para la germinación de acuerdo al análisis de varianza de dos factores no existieron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) utilizando los dos medios (KC4003 y KC4128) y los gelificantes (agar y gelrite) (figura 22), sin embargo se optó por el medio KC4128 con agar, como el más adecuado para continuar la siembra en este medio, disminuyendo la germinación (figura 23, figura 38). Mientras que no hubo grandes variaciones (1.1-1.4 μg) en el peso de las semillas (figura 2.4).

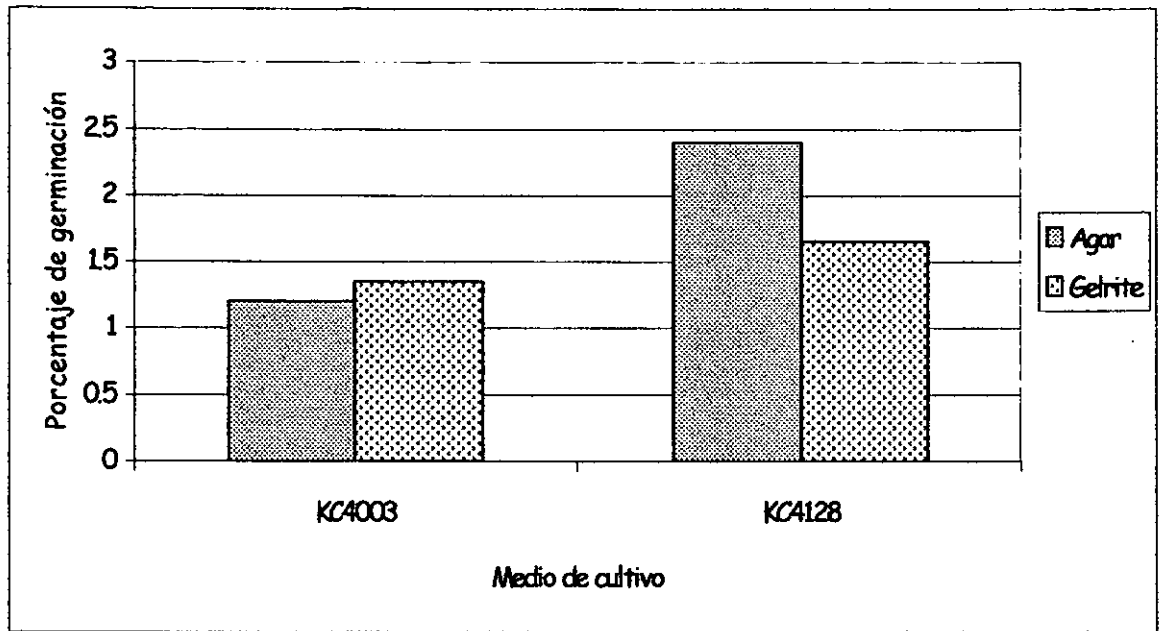


Figura 22.- Interacción entre los medios de cultivo y gelificantes en la germinación de *Laelia albida*.

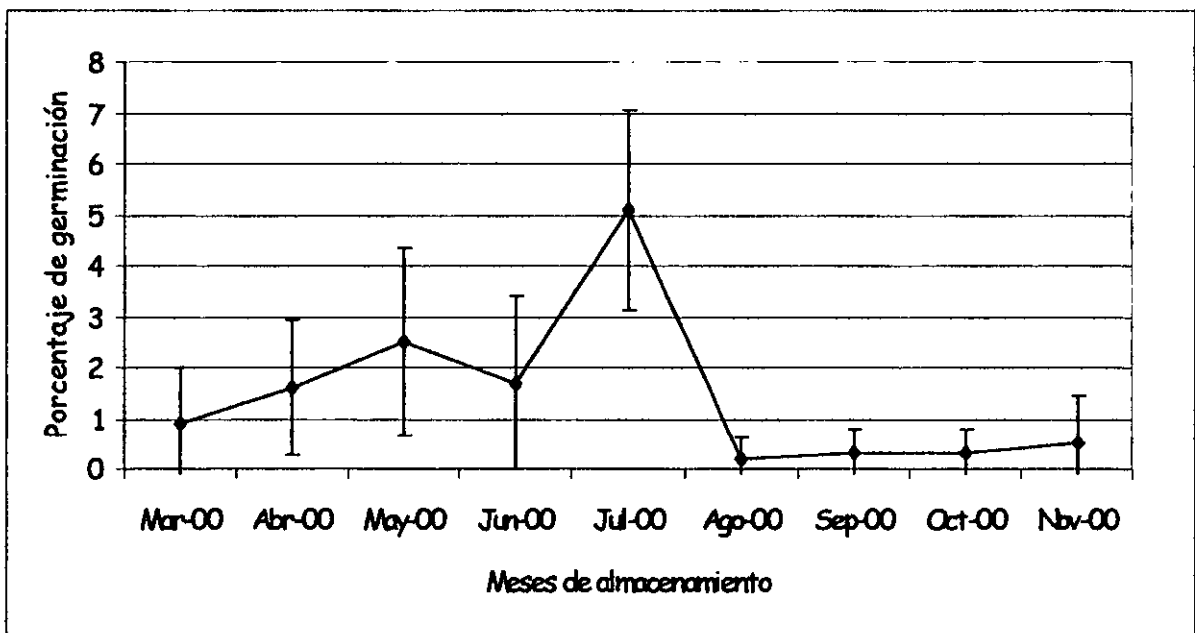


Figura 23.- Germinación de *Laelia albida* en el medio KC4128 gelrite, durante 8 meses de almacenamiento. Los porcentajes son el promedio \pm SD de 10 repeticiones.

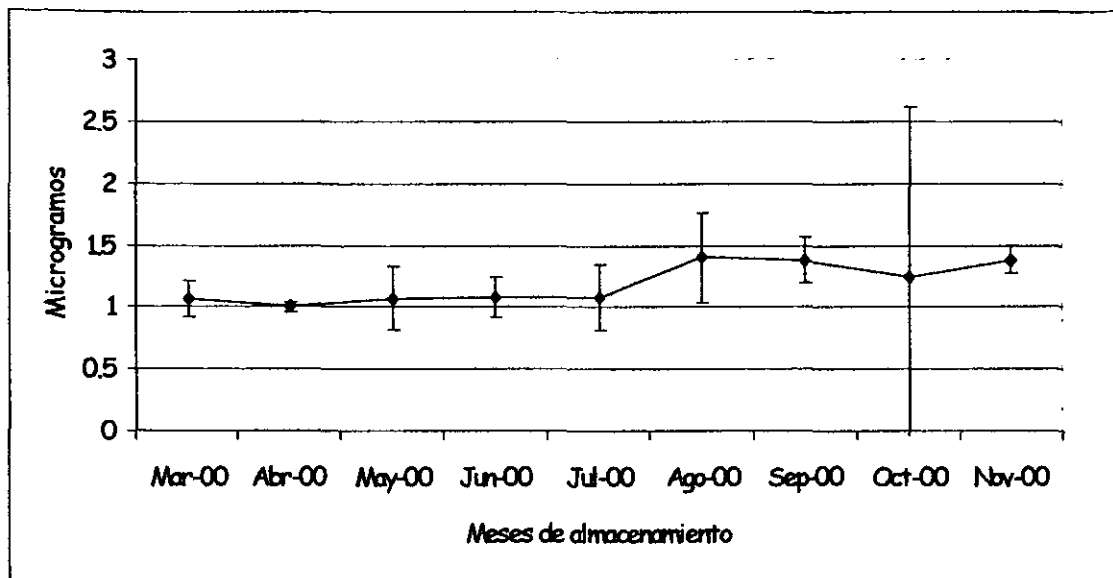


Figura 24.-Peso promedio de las semillas de *Laelia albida*, durante 8 meses de almacenamiento. Los porcentajes son el promedio \pm SD de 10 repeticiones.

No se halló correlación ($P > 0.05$) entre la viabilidad y la germinación ($r = 0.10$), viabilidad y peso ($r = 0.02$), (figuras 25 y 26). Con respecto a la prueba de t-Student hay diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.01$), entre el empleo de TTC y el diacetato de fluoresceína (figura 39, figura 41), en este último caso con un valor muy superior a del TTC.

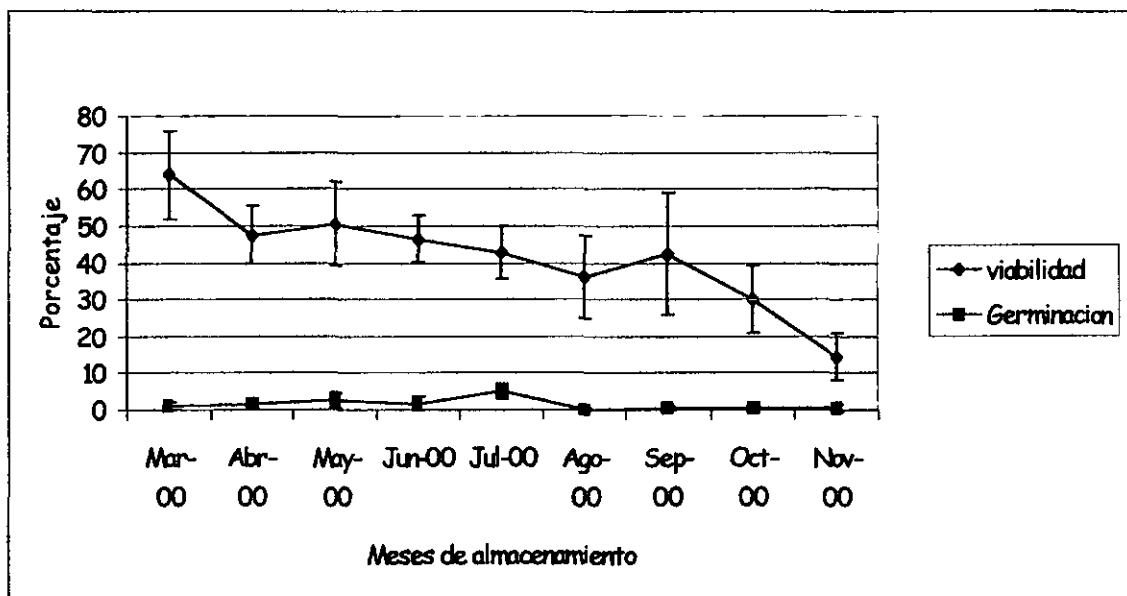


Figura 25.-Correlación entre el porcentaje de viabilidad (embriones teñidos) y el porcentaje de germinación de *Laelia albida*, medio KC4128 gelrite, durante 8 meses de almacenamiento. Los porcentajes son el promedio \pm SD de 10 repeticiones.

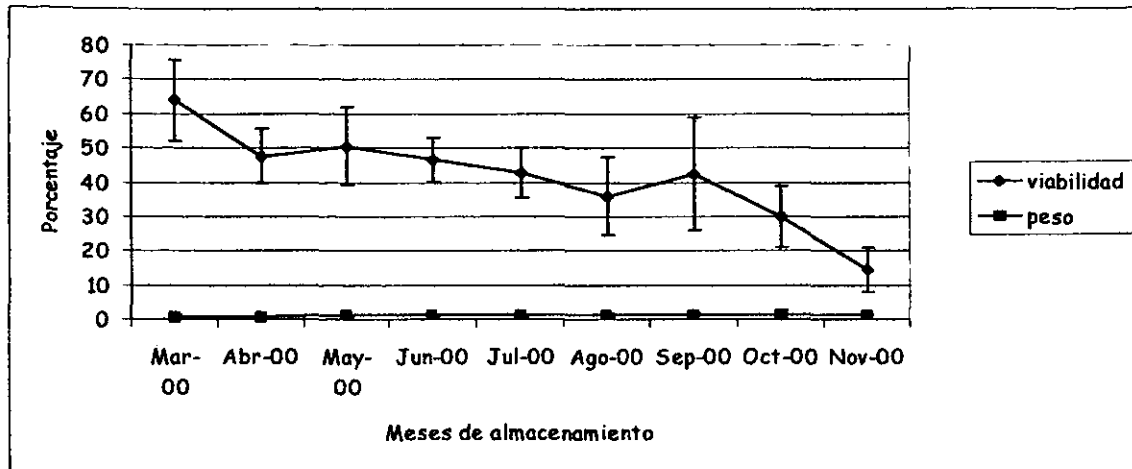


Figura 26.-Correlación entre el porcentaje de viabilidad (embriones teñidos) y peso de las semillas de *Laelia albida*, durante 8 meses de almacenamiento. Los porcentajes son el promedio \pm SD de 10 repeticiones.

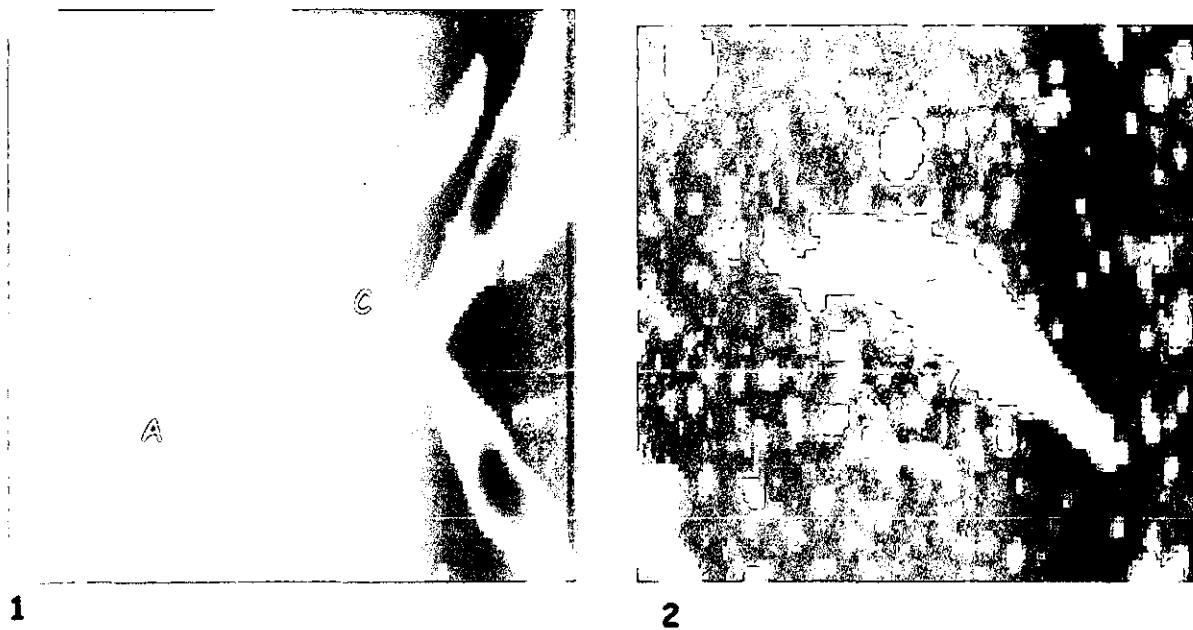


Figura 27.- Dos campos de *Laelia albida* tratadas con $(Ca(OCl)_2)$ 5% + 1% Tween 80 durante 24 hrs, posteriormente se incubaron con TTC durante 72 hrs. (A) semillas viables, (C) semillas sin embrión.

Oncidium brachyandrum

El valor superior fue para 1 hora de incubación con $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 5% + 1% Tween 80 (promedio 90.40), con 96 horas de incubación con TTC (figura 6, tabla 3, figura 37), por último el mayor número de embriones sin teñir se observó después de 24 horas de incubación con NaOCl 15%, seguido de 48 horas en TTC (promedio 94.20), (figura 7).

En este caso, el tiempo de almacenamiento de las semillas fue de un año y tres meses, debido a razones ajenas que impidieron tener una continuidad, observándose una disminución de la viabilidad (85.55 a 57.25) después de este tiempo (figura 28), como un aumento correspondiente (17.92 a 39.05) en el número de embriones amarillos (figura 29).

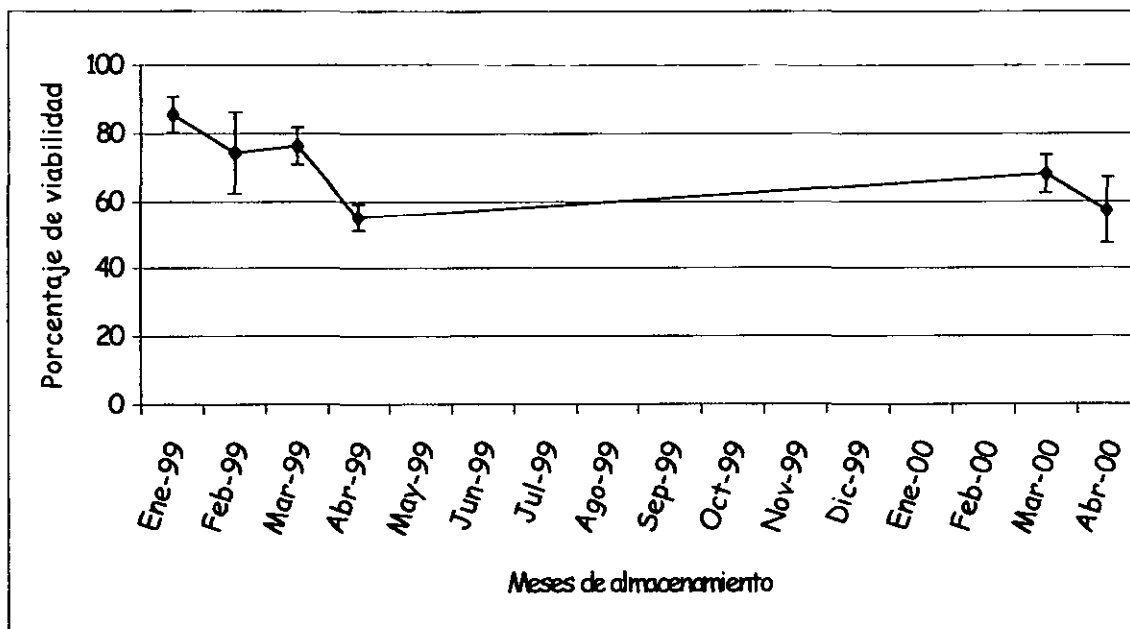


Figura 28.- Viabilidad (embriones teñidos) de *Oncidium brachyandrum*, durante 8 meses de almacenamiento. Los porcentajes son el promedio \pm SD de 10 repeticiones.

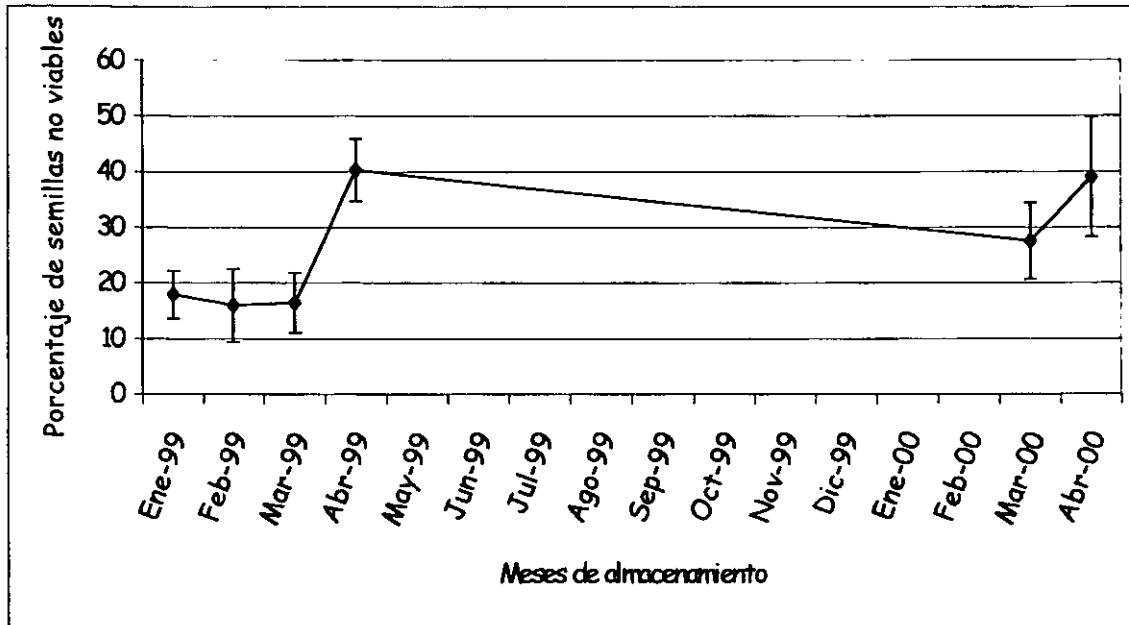


Figura 29.-Semillas no viables (embriones amarillos o blancos) de *Oncidium brachyandrum*, durante 8 meses de almacenamiento. Los porcentajes son el promedio \pm SD de 10 repeticiones.

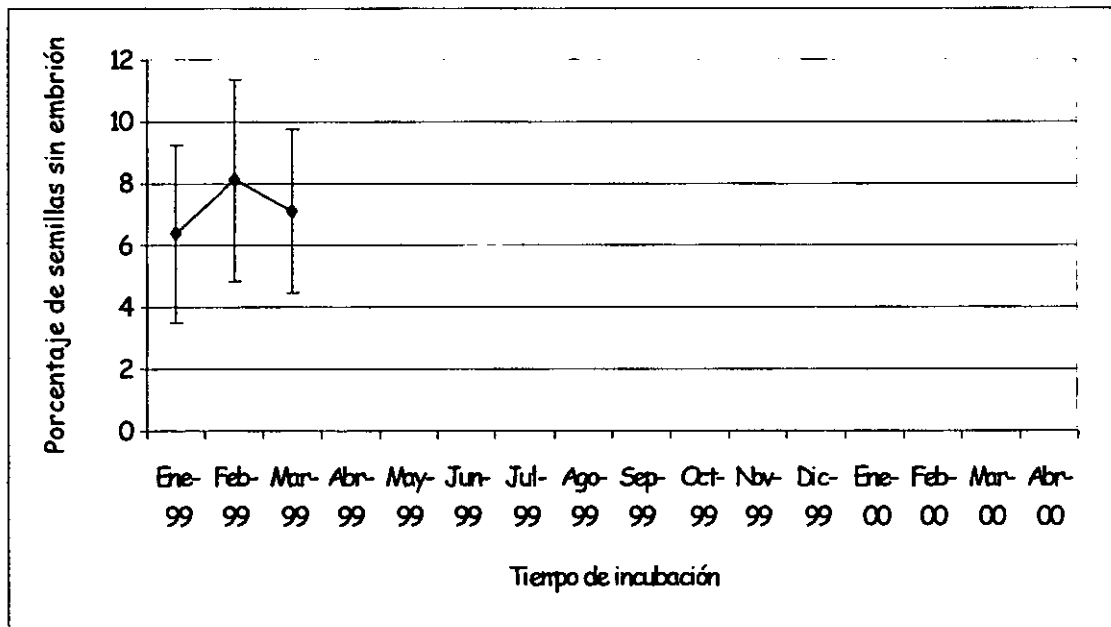


Figura 30.- Semillas sin embrión de *Oncidium brachyandrum*. Los porcentajes son el promedio \pm SD de 10 repeticiones.

Con respecto a la germinación de acuerdo a la Prueba de t-Student para dos muestras que se realizó para el medio KC4003 con agar y gelrite ($P > 0.05$) no hay diferencias significativas entre los gelificantes (figura 31). Se continuó el cultivo en ambos medios cayendo drásticamente la germinación después de los meses de almacenamiento, con el resultado de que incluso ninguna semilla llegó a germinar (figura 32, figura 38) en el último mes de su almacenamiento (KC-4003 agar, $34 \pm 7.66 - 0$, KC4003 gelrite $32 \pm 5.73 - 0$). Finalmente, el peso de las semillas ($0.7-1.2 \mu\text{g}$) tuvo una ligera variación (figura 33).

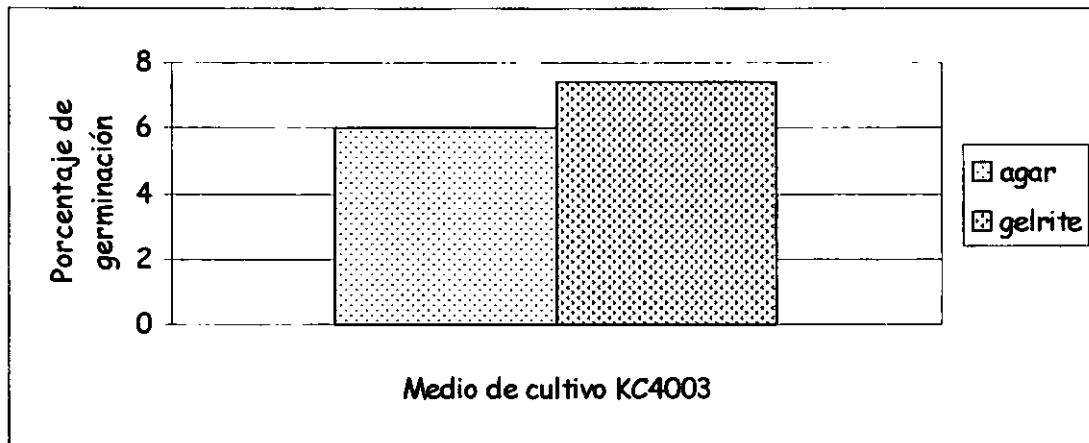


Figura 31.- Interacción en el medio de cultivo KC4003 (sigma) entre los gelificantes en la germinación de *Oncidium brachyandrum*.

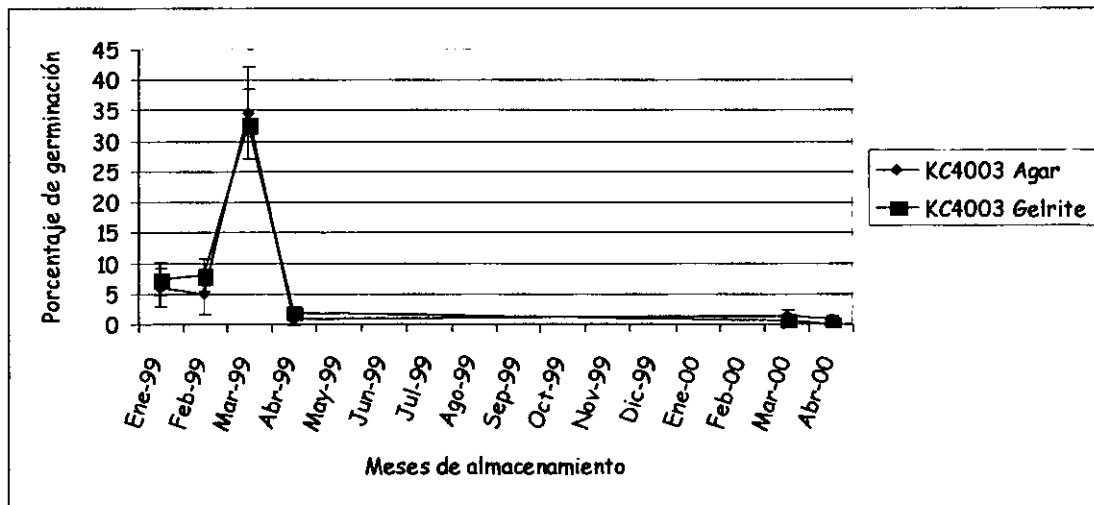


Figura 32.- Germinación de *Oncidium brachyandrum*, en KC4003, durante 8 meses de almacenamiento. Los porcentajes son el promedio \pm SD de 10 repeticiones.

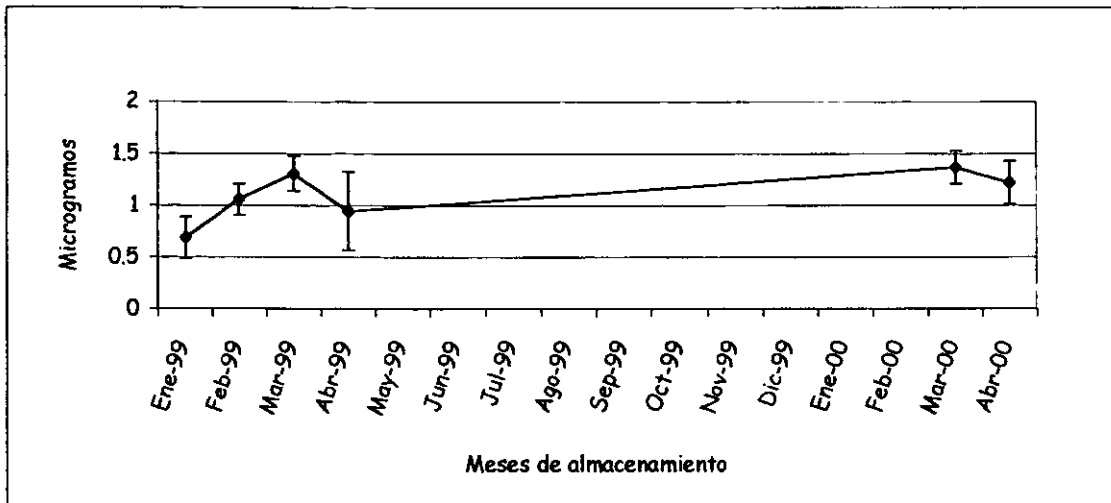


Figura 33.-Peso promedio de las semillas de *Oncidium brachyandrum*, durante 8 meses de almacenamiento. Los porcentajes son el promedio \pm SD de 10 repeticiones.

En cuanto a la correlación entre viabilidad y germinación ($P < 0.01$), a diferencia de las especies anteriormente estudiadas, si se mostró tanto para el medio KC4003-agar ($r = 0.33$) como el medio KC4003-gelrite ($r = 0.39$), (gráfica 34 y 35); pero no hubo correlación ($P > 0.01$), para la viabilidad y peso ($r = -0.18$), (gráfica 36).

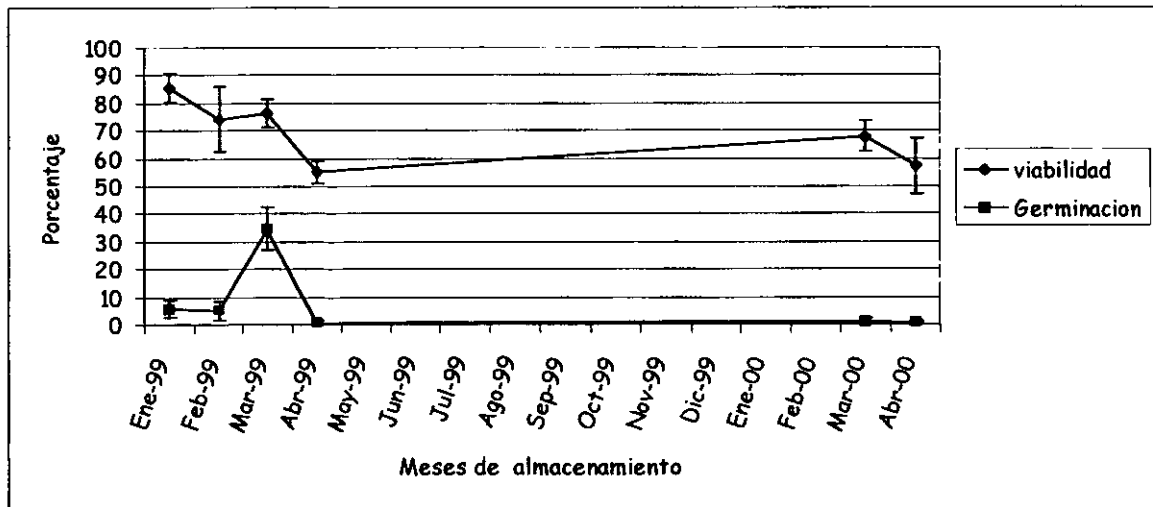


Figura 34.-Correlación entre el porcentaje de viabilidad (embriones teñidos) y el porcentaje de germinación de *Oncidium brachyandrum* en el medio KC4003-Agar, durante 8 meses de almacenamiento. Los porcentajes son el promedio \pm SD de 10 repeticiones.

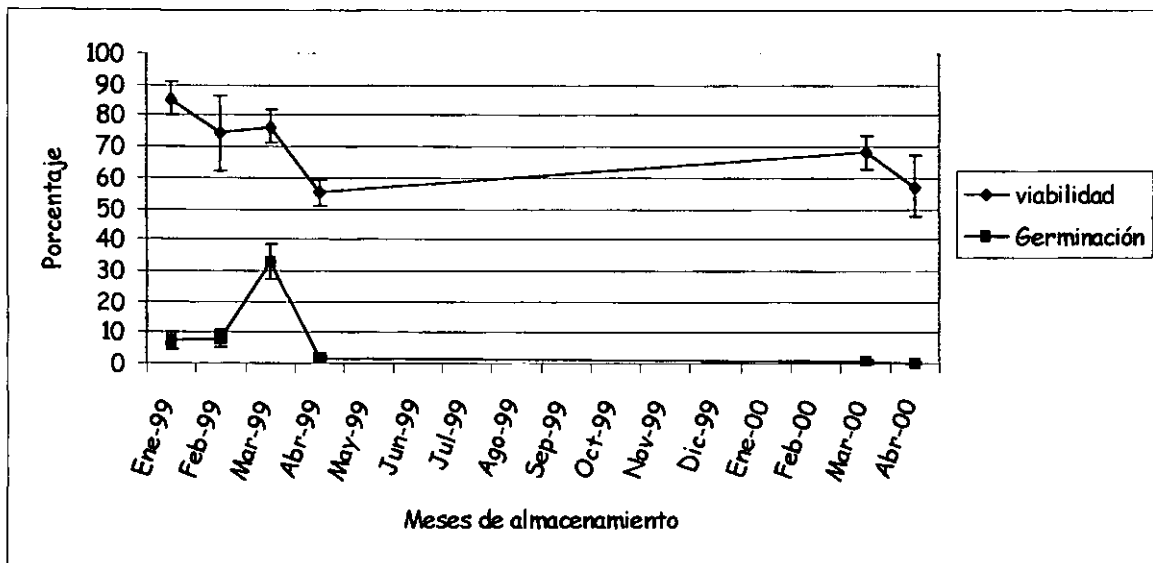


Figura 35.-Correlación entre el porcentaje de viabilidad (embriones teñidos) y el porcentaje de germinación de *Oncidium brachyandrum*, en el medio KC4003-Gelrite, durante 8 meses de almacenamiento. Los porcentajes son el promedio \pm SD de 10 repeticiones.

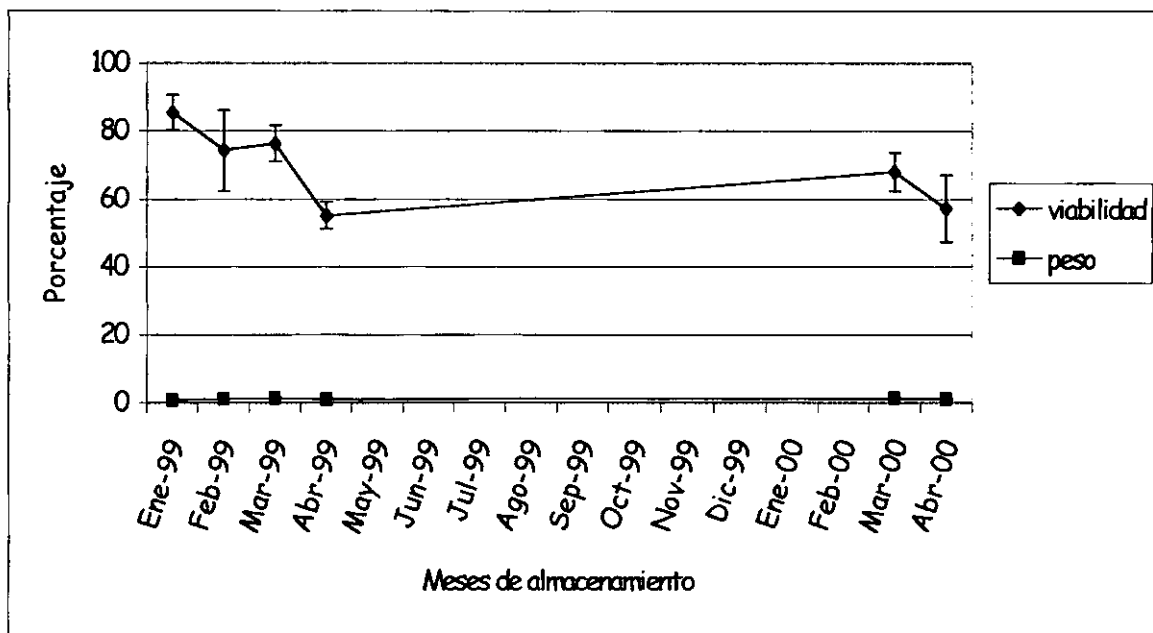


Figura 36.-Correlación entre el porcentaje de viabilidad (embriones teñidos) y el peso de las semillas de *Oncidium brachyandrum*, durante 8 meses de almacenamiento. Los porcentajes son el promedio \pm SD de 10 repeticiones.

1

2

Figura 37.- Dos campos de *Oncidium brachyandrum* tratadas con $(Ca(OCl)_2)$ 5% + 1% Tween 80 durante 1 hr, posteriormente se incubaron con TTC durante 96 hrs. (A) semillas viables, (B) semillas no viables y (C) semillas sin embrión.

A

B

C

D

Figura 38.- Germinación de semillas de (A) *Encyclia hanburii*; (B) *Laelia albida*; (C y D) *Oncidium brachyandrum*.

En relación con la prueba de t-Student se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$), entre el TTC y FDA (gráfica 30, figura 12).

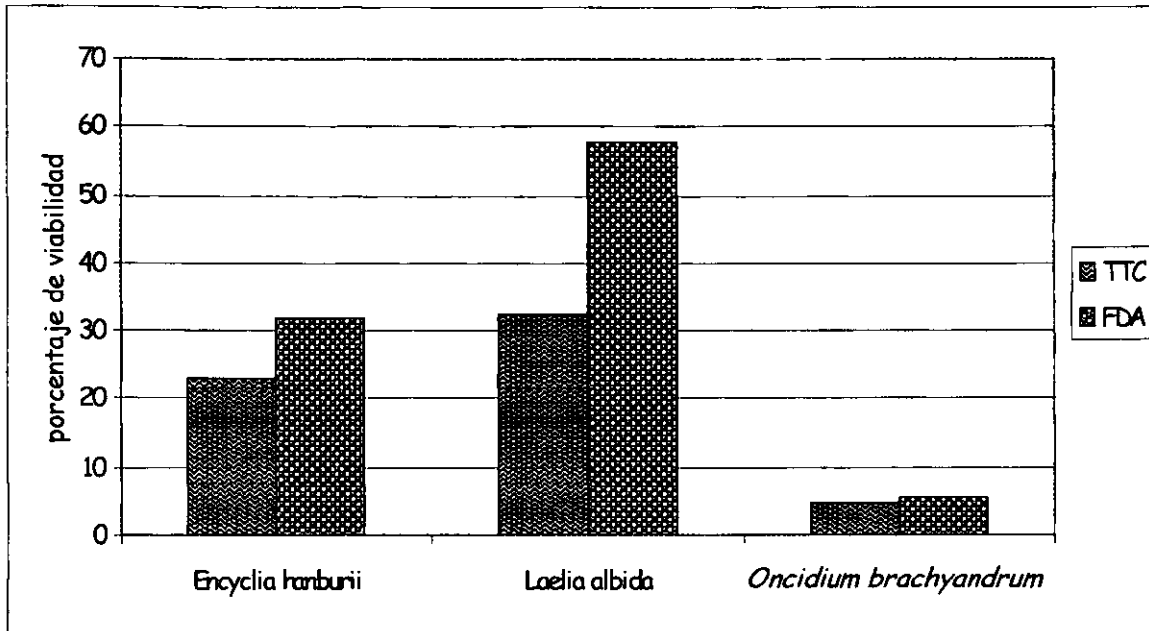


Figura 39.- Comparación del porcentaje de viabilidad determinada por dos métodos (TTC y FDA) de tres especies de orquídeas. Los porcentajes son el promedio \pm SD de 10 repeticiones.

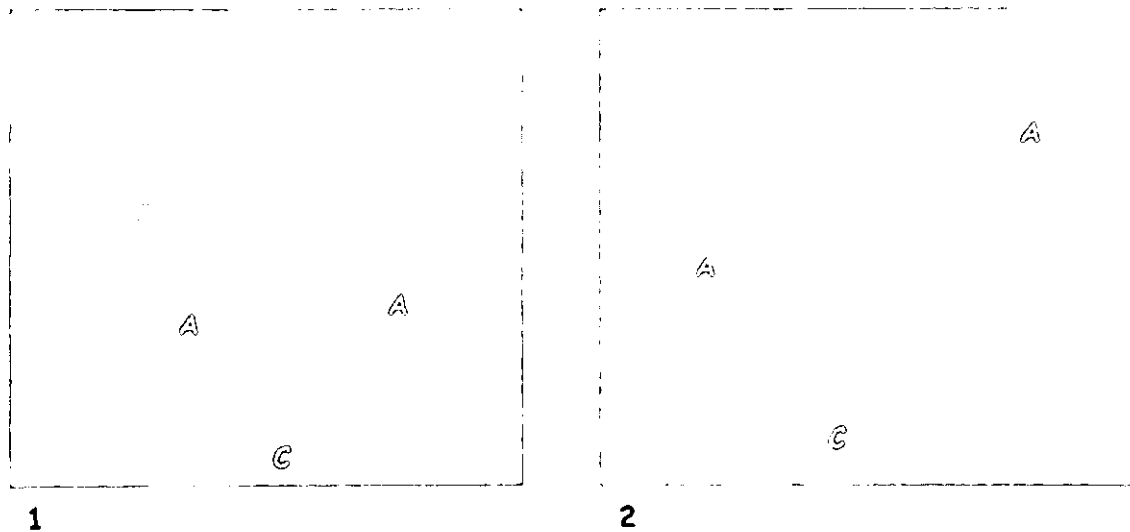


Figura 40.- Dos campos de *Encyclia hanburii*, tratadas con FDA. (A) semillas viables, (C) semillas sin embrión.

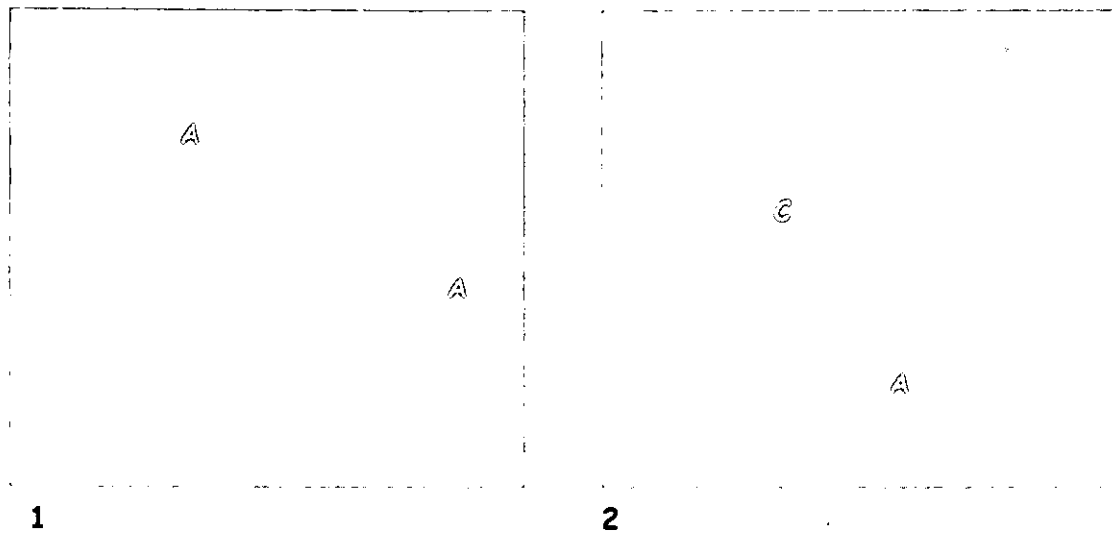


Figura 41.- Dos campos de *Laelia albida* tratadas con FDA. (A) semillas viables; (C) semillas sin embrión.

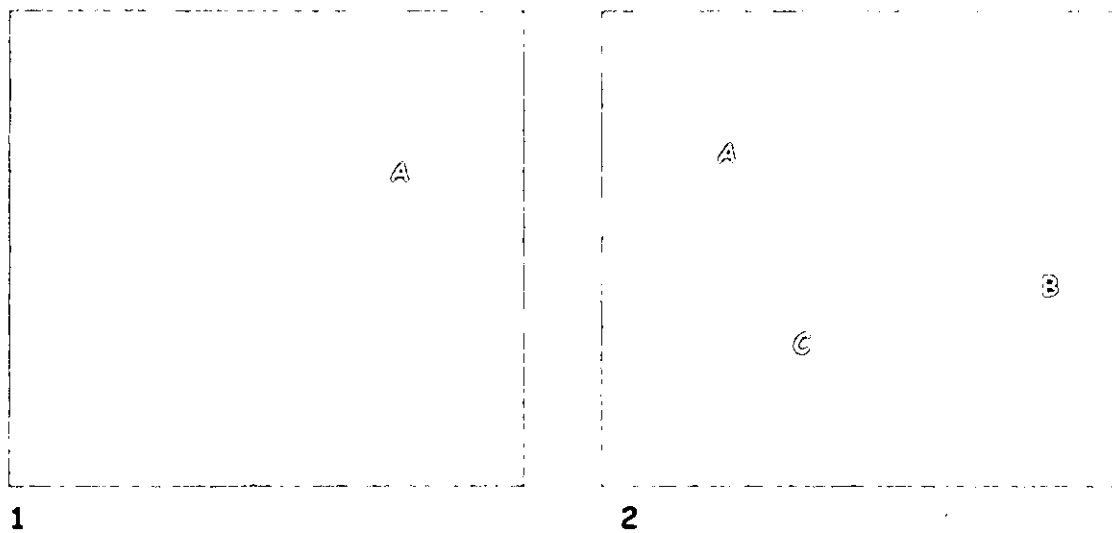


Figura 42.- Dos campos de *Oncidium brachyandrum* tratadas con FDA. (A) semillas viables, (B) semillas no viables y (C) semillas sin embrión.

Especie	Pretratamiento	Incubación con TTC (hrs)	Porcentaje de viabilidad
<i>Encyclia hanburii</i>	Agua (24 hrs)	24	38.40
		48	41.00
		72	41.20
		96	41.80
<i>Laelia albida</i>	(Ca(OCl) ₂) 5% + 1% Tween 80 (24 hrs)	24	46.70
		48	71.20
		72	71.60
		96	66.50
<i>Oncidium brachyandrum</i>	(Ca(OCl) ₂) 5% + 1% Tween 80 (1 hr)	24	84.20
		48	82.20
		72	85.40
		96	90.40

Tabla 3.- Tiempos del pretratamientos óptimos y de incubación con TTC, determinados por la prueba de LSD, para cada una de las especies estudiadas.

Especie	Mes	Días en que las semillas se tornan verdes	
<i>Encyclia hanburii</i>	Abril 2000	6	
	Mayo 2000	16	
	Junio 2000	9	
	Julio 2000	9	
	Agosto 2000	6	
	Septiembre 2000	7	
	Octubre 2000	7	
	Noviembre 2000	6	
	Diciembre 2000	6	
	<i>Laelia albida</i>	Marzo 2000	8
		Abril 2000	21
		Mayo 2000	9
Junio 2000		15	
Julio 2000		14	
Agosto 2000		20	
Septiembre 2000		18	
Octubre 2000		19	
Noviembre 2000		16	
<i>Oncidium brachyandrum</i>		Enero 1999	26
	Febrero 1999	7	
	Marzo 1999	6	
	Febrero 2000	14	
	Marzo 2000	10	
	Abril 2000	8	

Tabla 4.- Número de días en que tardaron en germinar las semillas de tres especies de orquídeas.

DISCUSION

Almacenamiento y peso de las semillas.

De acuerdo a Pritchard (s/a), los dos parámetros más importantes que afectan el potencial de almacenamiento de las semillas son humedad y temperatura. El almacenamiento de las semillas de orquídeas bajo diferentes contenidos de humedad y/o temperaturas puede relacionarse con la variación de longevidad de las semillas la cual llega a ser de unas semanas o varias décadas. Un contenido de humedad alto es considerado crítico ya que puede provocar daño a nivel celular disminuyendo la viabilidad de la semilla así como una reducción en el porcentaje de germinación y el subsecuente desarrollo de la plantula. Se ha reportado que las semillas de orquídeas pueden tolerar temperaturas de hasta $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$, pero con un contenido de humedad bajo (5 - 11%) para minimizar el rompimiento masivo celular a causa de la formación de cristales de agua.

Al realizar el análisis periódico del peso se detectaron ligeras variaciones durante el almacenamiento de las semillas, *Encyclia hanburii* (1.2 - 1.5 μg , fig. 14), *Laelia albida* (1.1 - 1.4 μg , fig.24), pero fue más evidente en *Oncidium brachyandrum* (0.7 - 1.2 μg , fig. 33), al parecer las semillas absorbieron agua lo cual pudo afectar la viabilidad como en el caso de *Encyclia handurii*, ya que la correlación entre viabilidad y peso fue positiva estadísticamente ($r=0.31$), pero no así en los casos de *Laelia albida* y *Oncidium brachyandrum*, debido a que las correlaciones fueron negativas (0.02 y -0.18, respectivamente) al parecer en estos casos, la humedad no tiene un efecto directo sobre la viabilidad.

Las semillas de las tres especies fueron almacenadas en bolsas de papel como lo sugiere Butcher (1989) , ya que al almacenarlas en bolsas de plástico o viales sin sellar inevitablemente permiten conservar humedad y crean condiciones ideales para las esporas fúngicas.

Prueba de viabilidad con Cloruro 2,3,5-Trifeniltetrazolio.

Las diferentes respuestas de las semillas de *Encyclia hanburii*, *Laelia albida* y *Oncidium brachyandrum*, a la prueba del método clásico de TTC probablemente se debieran a diferencias en la estructura y a variaciones en permeabilidad de la testa de la semilla, por ejemplo algunas orquídeas tienen una testa fuerte que no es permeable al agua y a otras sustancias.

Veyret (1969) citado por Van Waes (1986b) demostró que el grosor de la testa varía en función de su origen, por ejemplo, las semillas de especies tropicales pueden poseer fisuras naturales en su testa en comparación a las de zonas templadas que muchas veces tienen una testa intacta e impermeable (Lauzer, 1994; Van Waes 1986b).

En los casos específicos de las semillas de las especies estudiadas, pudo observarse que en *Encyclia hanburii* después de un tiempo prolongado (24 hrs) de exposición al agua, la entrada de TTC a la semilla fue notoria por lo que podría asumirse que su testa no es tan dura como aparentemente lo son las de *Laelia albida* y *Oncidium brachyandrum*, ya que en estas dos últimas el pretratamiento con $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 5% + 1% Tween 80, fue necesario. Las soluciones de hipoclorito de calcio tienen por lo menos dos efectos sobre la semilla de orquídea: 1) esterilización y 2) la remoción de la suberina en los integumentos mejorando la difusión y permeabilidad para el agua. La testa es degradada por alcalinización y oxidación. La cantidad

de suberina varía con la especie. Generalmente, al observar por microscopía óptica un integumento más oscuro significa más suberización y la necesidad de un tiempo más largo de la solución de hipoclorito (Van Waes y Debergh, 1986a), esto explicaría los diferentes efectos de la prueba de TTC sobre las semillas, la relación entre la duración del pretratamiento con $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 5% más Tween 80 1%, y el porcentaje de embriones teñidos después con la prueba de TTC, la oxidación progresiva de la testa de la semilla, trae consigo una permeabilidad más alta aumentando los daños a la testa, también habría que tomar en cuenta que la molécula de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ es mas grande que la de NaOCl , por lo cual tal vez no entre inmediatamente en contacto con el embrión, por otro lado, en combinación con el Tween tienen una mayor influencia en la testa, ya que este último es un detergente, en consecuencia tiene afinidad por los materiales no polares como sería el caso de grasas o ácidos grasos, cuando la superficie de la testa entra en contacto con el Tween, la parte no polar de éste desplaza la película de aceite o grasa que cubre la testa; al mismo tiempo emulsionandola y permitiendo posiblemente la entrada de agua al interior de la semilla (Rakoff, 1990).

Según observaciones realizadas por Van Waes y Debergh (1986a) con ayuda de microscopía electrónica de barrido en semillas de especies de orquídeas terrestres europeas, el pretratamiento con $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 5% más Tween 80 1%, influyó en la estructura de la testa, causando pequeñas rupturas de acuerdo al tiempo de incubación y encontraron una relación entre los embriones teñidos y las rupturas ocasionadas por el pretratamiento. Determinaron también que aparecieron rupturas adicionales en las testas por tratamientos más largos y resultaron en porcentajes más altos de embriones teñidos (Van Waes y Debergh, 1986a y b).

El pretratamiento más dañino para las semillas de las tres especies de este estudio fue el de hipoclorito de sodio en sus diferentes concentraciones. La exposición prolongada al hipoclorito de sodio ocasiona que la testa experimente una ruptura severa y por lo tanto, dañe a los embriones, ya que estos se observaron blancos e incluso en algunos casos transparentes.

Posiblemente el deterioro al embrión sea causado a que es una molécula mas pequeña que el hipoclorito de calcio y penetre más fácilmente hacia el interior de la semilla, al mismo tiempo de que el hipoclorito de sodio puede formar ácido hipocloroso, este penetra fácilmente a las células actuando directamente sobre proteínas y ácidos nucleicos (Prescott, 1993; Tortora, 1995).

Aunque aparentemente es desventajoso emplear el hipoclorito de sodio como pretratamiento para optimizar el método de TTC, no siempre es así; Vujanovic (2000) reporta que para determinar la viabilidad en semillas de *Cypripedium reginae*, *Cypripedium parviflorum* y *Platanthera grandifolia* fue necesario aplicar un pretratamiento con NaOCl al 10% por mas de dos horas para poder estimar la viabilidad de las semillas con TTC.

En términos generales, los porcentajes de viabilidad de las tres especies de orquídeas disminuyeron durante el almacenamiento de 8 meses, siendo estos más notorio en *Laelia albida* seguido de *Encyclia hanburii*, y *Oncidium branchyandrum*. Debe hacerse notar que en *Laelia albida* y *Encyclia hanburii*, casi alrededor del 40% de las semillas no poseían embrión; en contraste con *Oncidium branchyandrum* en el que casi el 90% de las semillas poseían embriones.

Humphrey (1960, citado por Seaton, 1989) anotó que, en general, las semillas de orquídeas pierden su viabilidad alrededor de 9 meses de almacenamiento, mientras Knudson reportó que al almacenar las semillas a temperatura ambiente pierden su viabilidad en forma relativamente rápida, por ejemplo, semillas de *Odontoglossum* pierden su viabilidad en semanas y las de *Cymbidium* en pocos meses. Las semillas pueden permanecer viables hasta 20 años si son almacenadas a 4° C con desecante (Pritchard, 1993; Shoushtari, 1994).

Prueba de viabilidad con Diacetato de Fluoresceína.

Como se habrá notado, en ambos métodos (TTC y FDA) existe la necesidad de aplicar un pretratamiento a fin de calcular mejor el porcentaje de viabilidad (Pritchard, 1985; Van Waes y Debergh, 1986a). Sin embargo, en el caso del FDA es necesario contar con un microscopio de fluorescencia para observar dicha reacción, además de que el costo del FDA es superior al del TTC, pero si se dispone de lo necesario para desarrollar este método se recomienda usarlo para determinar la viabilidad de las semillas, que en este caso arrojó mejores resultados en los porcentajes de viabilidad de *Encyclia hanburri* y *Laelia albida*. En caso de que no se cuente con el material adecuado, la prueba de TTC ofrece una alternativa recomendable en este aspecto, además de ser sencilla, rápida y económica.

Germinación.

Con relación a la germinación hubo una disminución en su porcentaje que fue más notable en *Oncidium brachyandrum* (fig. 32), en menor grado, *Laelia albida* (fig. 23) y por último *Encyclia hanburrii* (fig 13). La dificultad de germinación puede ser explicada por el grado de maduración, condiciones de la planta madre, calidad de las semillas, condiciones de cultivo y almacenamiento, además de la simbiosis necesaria con hongos cuyos efectos son poco conocidos y difíciles de reproducir bajo condiciones artificiales, además de que la permeabilidad de la testa, también influye como ya se explicó. Rasmussen (1992, citado por Lauzer 1994) mostró que las semillas de *Epipactis palustris* Crauz, necesitaban de un tratamiento para romper la testa (escarificación), de igual forma, Rasmussen (1995, citado por Miyoshi, 1998) recomienda utilizar el hipoclorito de calcio como desinfectante en vez del usar hipoclorito de sodio, ya que el primero aumenta la frecuencia de germinación de las semillas, aunque el mecanismo de acción, se desconoce. Por último, la presencia de inhibidores es otro factor a considerar (Lauzer 1994, Van Waes, 1986b).

El medio Knudson ha sido adecuado para el cultivo de orquídeas epífitas o tropicales, o ambas. De manera general con medio el KC4128 se obtuvieron mejores resultados en la germinación de *Encyclia hanburrii* y *Laelia albida*, sin embargo, en el caso de *Oncidium brachyandrum* sólo se empleó el medio KC4003 y no se comparó con el medio KC4128 debido a que este último no estuvo disponible al momento de realizar las pruebas de viabilidad, ya que ambos debieron compararse a la par en germinación y viabilidad.

Algunas especies terrestres, no obstante, son más deficientes para germinar. El amonio, nitrato y urea son fuentes adecuadas de nitrógeno para la germinación de orquídeas, aunque algunas especies no germinan en presencia de amonio, ya que lo emplean después de 60 días de haber germinado (es el caso de *Cattleya*), las especies terrestres germinan mejor en medio con bajas concentraciones de calcio.

Los microelementos no siempre se incluyen en el medio debido a que suficientes cantidades parecen estar presentes en el azúcar, agar o sales (Arditti, 1984).

Por otra parte, con los gelificantes (agar y gelrite) empleados para este experimento no hubo variaciones importantes, aunque un problema con el agar es su calidad variable y pureza, a pesar de ser el agente gelificante que forma de mayor parte del medio pudiendo afectar significativamente el desarrollo. El gelrite es preferido con respecto al agar debido a su alta pureza y calidad consistente. El trabajo realizado por Huang en 1995 mostró que los cultivos en gelrite son superiores que al agar, debido a que los resultados obtenidos, aunque el inconveniente del gelrite es que favorece la vitrificación (Huang, 1995; Smith, 2000).

Con respecto al tiempo en que las semillas germinaron y se tornaron verdes, Lauzer (1994) y Van Waes (1986b) mencionan que es dentro de un periodo de 10 a 30 días después de ser colocadas en el medio de cultivo que esto ocurre, en el presente trabajo, las semillas germinaron en periodos similares (6 - 26 días, tabla 4) en los medios de cultivos, por lo que al parecer las condiciones del almacenamiento no afectaron la germinación.

Correlación de la viabilidad y germinación.

Con respecto a la correlación entre la prueba de viabilidad con TTC y germinación, Lauzet et.al. (1994) trabajaron con *Cypripedium acaule* y no obtuvieron una correlación positiva entre ambas. Por otra parte, Shoushtari et al. (1994), obtuvieron correlaciones muy definidas en 30 especies de orquídeas. Es importante hacer notar que aunque en el presente trabajo no hubo una correlación entre la viabilidad y la germinación de *Encyclia hanburii* y *Laelia albida*, esto no quiere decir que la prueba de TTC no sea efectiva o que de manera definitiva no se puedan realizar correlaciones, más bien habría que depurar el trabajo experimental con respecto al medio de cultivo. Como ejemplo, Harvais (1982), (citado por Van Waes, 1986b) menciona que el regulador de crecimiento más importante durante la germinación de orquídeas son las citocinina, del mismo modo se podría trabajar con la adición de algunos complejos naturales como el agua de coco, ya que de acuerdo al trabajo realizado por, Yam (1988), ese aditivo orgánico mejoró la germinación de 17 especies y la resiembra de 18 especies de orquídeas.

Utilidad de los datos.

Como se mencionó al inicio, la conservación de especies vegetales, ha generado la necesidad de crear bancos de semillas para su almacenamiento, por consiguiente, de información, como es el caso de *Encyclia hanburii*, *Laelia albida* y *Oncidium branchyandrum*; que hasta el momento, no se han encontrado reportes de investigaciones sobre estas especies, además que en la zona de estudio es difícil encontrar ejemplares en áreas en donde no haya influencia del hombre.

Recomendaciones

Para aumentar el conocimiento de la biología de estas especies es conveniente implementar estudios con microscopia electrónica para conocer las características de las testas de las semillas de las especies *Encyclia hanburii*, *Laelia albida* y *Oncidium branchyandrum*.

Profundizar en/o los mecanismos de acción tanto del hipoclorito de sodio como el de calcio a nivel celular y molecular.

Con respecto a la germinación emplear otros medios de cultivo, hormonas, diferentes concentraciones de hormonas y de algunos aditivos como el agua de coco o extracto de plátano, además de realizar la germinación simbiótica de las semillas, todo lo anterior con la finalidad de optimizar la germinación.

CONCLUSIONES

- El método de cloruro de trifeniltetrazolio con las modificaciones señaladas para cada especie fue satisfactorio para determinar la viabilidad de las semillas de *Encyclia hanburii*, *Laelia albida* y *Oncidium brachyandrum*.
- En el caso de *Encyclia hanburii*, el pretratamiento más favorable fue de 24 hrs de incubación con agua destilada, con 96 hrs en TTC obteniendo un porcentaje de viabilidad de 41.8%, los medios que favorecieron la germinación fueron KC4003-Agar y KC4128-Gelrite.
- Para *Laelia albida* el pretratamiento efectivo fue de 24 hrs de incubación en $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 5% + 1% Tween 80, con 72 hrs en TTC con un porcentaje de viabilidad de 71.60%, el medio adecuado para la germinación fue KC4128-Gelrite.
- En *Oncidium brachyandrum* el pretratamiento apropiado fue de 1 hr de incubación en $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 5% + 1% Tween 80; con 96 hrs en TTC con un porcentaje de viabilidad de 90.40%, el medio conveniente para la germinación fue KC4003- Agar y KC4003-Gelrite.
- La viabilidad y la germinación en *Encyclia hanburii*, *Laelia albida* y *Oncidium brachyandrum* disminuyeron de manera general, durante el almacenamiento de sus semillas.
- Aunque no existió correlación entre el porcentaje de viabilidad y de germinación en los casos de *Encyclia hanburii* y *Laelia albida*, esto no significa un impedimento para

realizarlas, es necesario probar otras condiciones tanto de las pruebas de viabilidad así como de la germinación.

- Los resultados obtenidos de las pruebas de viabilidad complementadas con los datos de germinación permiten establecer un punto de partida conveniente para el manejo de estas y otras especies en bancos de germoplasma.

APÉNDICE.

I.- Preparación de la solución de Cloruro 2,3,5-Trifeniltetrazolio (TTC).

- 10 g de cloruro 2,3,5-Trifeniltetrazolio.
- 1000 ml de agua destilada.
- Disolver el TTC y ajustar el pH a 7 con 1M de NaOH. Almacenar la solución en oscuridad a $20 \pm 2^\circ\text{C}$. (Van Waes, 1986a).

II.- Preparación de la solución de Diacetato de fluoresceína (FDA).

- 0.5 gr de diacetato de fluoresceína.
- 100 ml de acetona absoluta.
- Disolver el FDA en la acetona. Almacenar en oscuridad a 4°C (Pritchard, 1985).

Observar las preparaciones en microscopio de fluorescencia SS, realizar con los filtros 400 - 440, FT460, LP470.

Composición de los medios de cultivo Sigma.

Sales inorgánicas	Medio K 4003 Cantidad mg/L	Medio K 4128 Cantidad mg/L
Sulfato de amonio	500.0	500.0
Nitrato de calcio. 4 H ₂ O	694.4	347.2
Sulfato de cobre. 5 H ₂ O	0.0624	0.0
Sulfato ferroso. 7 H ₂ O	25.0	25.0
Sulfato de magnesio anhidro	122.125	122.125
Sulfato de manganeso	5.682	5.682
Trióxido de molibdeno	0.016	0.0
Fosfato de potasio monobásico	250.0	250.0
Sulfato de zinc. 7 H ₂ O	0.331	0.0
Sacarosa	20 000	20 000
Gramos de polvo requeridos para un litro	21.6	22.0

Dávila, A.P., Villaseñor, R.L.L. Medina L.R., Ramirez R.A., Salinas, T.A., Sánchez-Ken J. y Tenorio, L.P. 1993. Listado florístico de México X. Flora del Valle de Tehuacán - Cuicatlán. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.

Davis, A. 1946. Orchid seed and seed germination. American orchid society bulletin. October 14: 218 - 223.

Dessler, R.L y G.E. Pollard, 1976. The genus *Encyclia* in Mexico. Asociación Mexicana de Orquideología, A.C. Editor Eric Hagsater. México.

Fast, G. 1982. European terrestrial orchids. Symbiotic and asymbiotic methods. En *Orchid biology, Reviews and Perspectives II* (J. Arditti, ed), Comstock Publishing Associates. Ithaca. pp: 309 - 326.

Gahan, P. 1984. Plant histochemistry and cytochemistry, an introduction. Academic press. Unites States of America.

Gibson, M. S. 1996. Measurement of vigor in seed or seedlings. Plant Physiologist American Crystal Research Center. <http://telework.ucdavis.edu/Propagation/Propagation5.htm>

Hágsater, E. 1975. *Oncidium branchyandrum*, *Oncidium graminifolium* y *Oncidium endocharis*. Orquídea. 5:67 - 79.

Halbinger, F. 1993. Laelias de México. Ed. Asociación Mexicana de Orquideología A.C. México D.F. pp:19 - 20.

Harrison, C.R. y J. Arditti. 1978. Physiological changes during the germination of *Catleya aurantiaca* (Orchidaceae). Bot. Gaz. 139: 180 - 189.

Pritchard, H.W. 1993. Orchid seed storage: historical perspective, current status, and future prospects for long-term conservation. *Selbyana* 14:89 - 104.

Pritchard, H.W. sin/año. Growth and storage of orchid seeds. Jodrell Laboratory. Royal Botanic Gardens Kew. Wakehurst Place. Ardingly. Sussex RH17 6TN.

Rakoff Henry y N. C. Rose. 1990. Química orgánica fundamental. Decimasegunda reimpression. Editorial Limusa. México D.F.

Royal Botanic Gardens Kew. sin/año:..The Sainsbury orchid conservation project: propagation for conservation. Kew information sheet K15.

Rubluo A., V. Chávez; A.P. Martínez y Martínez-Vázquez. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture, *Biological Conservation* . 63:163 - 169.

Rzedowski, J.1988. Vegetación de México. Ed. Limusa. Cuarta reimpression. México. D.F..

Rzedowski, J. 1993. Diversity and origins of the phanerogamic flora of México. In: Ramamoorthy T.P., Robert Bye, Antonio Lot y John Fa. Biological diversity of México: Origins and distribution. Oxford University Press. United States of America.

Rzedowski, J. 1996. Análisis preliminar de la flora vascular de los bosques mesófilos de montaña de México. *Acta Botánica Mexicana*. 35:25 - 44.

Rzedowski, J. 1997. El endemismo en la flora fanerogamica mexicana: una apreciación analítica preliminar. Consejo Nacional para la Ciencia y Tecnología, <http://dell.ieco.conacyt.mx/BD/bdmexend.html>

Seaton, P.T. & N.S.J. Hailes. 1989. Effect of temperature and moisture content on the viability of *Cattleya aurantiaca* seed. In Seaton P.T. y N.S.J. Hailes, Modern methods in orchid

Vázquez Yanes C., 1987. Los bancos de almacenamiento de semillas en la conservación de especies vegetales. *Ciencia*. 38:239-246.

Vázquez Yanes C., A. Orozco, M. Rojas, M. E. Sánchez y V. Cervantes, 1997. La reproducción de las plantas: semillas y meristemas. *La ciencia para todos #157*, Fondo de Cultura Económica, México.

Veyret, Y. 1974. Development of the embryo and theyoung seedling stages of orchids. En *The orchids scientific studies*. C.L. Withiner Ed. Willey.

Vujanovic Vladimir, M. Arnaud, D. Barabé y G. Thibeault. 2000. Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. *Annals of Botany*. 86:79 - 86.

Wiard, L. A. 1987. An introduction of the orchids of México. Comstock publishing associates. United Staes of America.

Widholm, J.M. 1972. The use of fluorcein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultures plant cells. *Stain technology*, 47: 189.

Williams - Linera, G., G. Halffter y E. Ezcurra. 1997. Estado de la biodiversidad en México, Consejo Nacional para la Ciencia y Tecnología, <http://dell.ieco.conacyt.mx/BD/bdmexest.html>

Yam, T.W. y M.A. Weatherhead. 1988. Germination and seeling development of some Hong Kong orchids. *Lidleyana* 3: 156 - 160

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA