



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Germinación asimbiótica *in vitro*
de
Govenia capitata
(Orchidaceae)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIOLOGO

PRESENTA

Susana Padrón Hernández

Área: Biología Vegetal

Director de tesis: M. en C. Amadeo Barba Álvarez

Unidad de Investigación en Biología Vegetal





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.

DEDICATORIAS

Les dedico esta tesis a mis padres; Ricardo Padrón S. y Estela Hernández C. además les agradezco todo el apoyo brindado en todos los aspectos de mi vida, ya que sin su apoyo y comprensión no estaría compartiendo este momento. ETERNAMENTE GRACIAS.

Les dedico también esta tesis a mis primos Estela Jiménez, Marcos Ayala y Rafael Ayala, ya que con su ayuda, apoyo y comprensión pude concluir mi carrera. GRACIAS POR SIEMPRE.

AGRADECIMIENTOS

Les agradezco el haber estado conmigo en todo momento a mis amigas Liliana Licea, Beatriz López y Paola Rodríguez y a mis amigos Moisés Rojas, Hugo Sierra, que aunque no nos frecuentamos seguido siempre han estado presentes para mí.

También les agradezco los momentos que conviví con todos mis compañeros ya que son parte importante de mi vida, en especial a Rosy, Vicky, Rebe, Sinai, Luis y Eric.

Sincera y ampliamente agradezco el apoyo personal, profesional y la confianza brindada por el M en C Amadeo Barba. Gracias.

A la M en C Susana Luna le agradezco la confianza como persona, el apoyo y observaciones en la realización de esta tesis. Gracias.

Al Biol. Juan Romero, le agradezco las acertadas observaciones y el apoyo brindado en la elaboración de esta tesis. Gracias.

Agradezco las observaciones brindadas para el mejoramiento en la elaboración de esta tesis al Biol. Marco Antonio Hernández y a la M en C María de Jesús Sánchez.

Al Dr. Alfredo Miranda por haberme brindado apoyo en un momento difícil en la carrera. Gracias.

Agradezco también al maestro Armando Cervantes, la Maestra Paty, al maestro Carlos Castillejos, al Biol. Joel Romero a la Prof. Ángeles y a la Prof. María Eugenia Ibarra, por haber estado siempre al pendiente de mi formación como profesionista.

Agradezco también a la Jefa de la carrera de biología Maricela Arteaga por las atenciones recibidas a lo largo de la carrera.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por las facilidades que nos brinda para adquirir los conocimientos y poder obtener una formación como profesionista.

Contenido	Página
I Resumen.....	6
II Introducción	7
III Marco teórico.....	9
1 Estructura de las semillas de orquídea	9
1.1 Papel del hongo simbionte en la germinación de orquídeas.....	10
Germinación	
1.1.1 Germinación simbiótica.....	10
1.1.2 Germinación asimbiótica.....	13
1.2 Tiempo de germinación.....	17
1.3 Desarrollo ontogénico (semilla- planta).....	18
1.4 Factores que afectan la germinación.....	22
1.5 El papel de los carbohidratos en la germinación de las orquídeas.....	22
1.6 El papel de los extractos naturales en la germinación de las orquídeas.....	26
2 Genero <i>Govenia</i>	27
2.1 <i>Govenia capitata</i>	27
2.1.2 Descripción de la planta.....	29
2.1.3 Clasificación taxonómica.....	32
2.1.4 Usos.....	33
IV Objetivos y Metas.....	34
V Metodología.....	36
1. Almacenamiento de semillas.....	37
1.1 Desinfestación de semillas.....	37
1.2 Evaluación de la viabilidad.....	38
1.3 Siembra <i>in vitro</i> de semillas en cinco medios de cultivo.....	38

1.4	Siembra <i>in vitro</i>	38
1.5	Evaluación de la viabilidad de las semillas en los medios de cultivo para la elección del mejor medio.....	39
1.6	Prueba de carbohidratos experimentales con cada uno de los medios seleccionados.....	40
1.6	Evaluación y selección del mejor medio y fuente de carbohidrato para el desarrollo de las plántulas.....	39
1.7	Evaluación y selección del mejor medio y fuente de carbohidrato para el desarrollo de las plántulas.....	40
1.8	Evaluación de los eventos ontogénicos y tiempo de desarrollo.....	41
1.9	Diseño experimental.....	42
1.9.1	Pruebas de viabilidad.....	42
1.9.2	Siembra <i>in vitro</i>	42
VI	Resultados.....	45
1.	Viabilidad de las semillas.....	45
1.1	Viabilidad de las semillas en los medios de cultivo.....	46
2.	Generación de protocormos.....	49
3.	Desarrollo ontogénico de <i>Govenia capitata</i>	54
VII	Discusión de resultados.....	65
1.	Pruebas de viabilidad en semillas de <i>Govenia capitata</i>	65
2.	Comportamiento de los embriones cultivados en los cinco medio nutritivos experimentales (MS, KC, Dixon, SP1,SP2).....	66
3.	Efecto de la adición de diferentes carbohidratos y de complejos naturales.....	70
4.	Germinación <i>in vitro</i>	73
4.1	Nutrición.....	73
4.2	Velocidad de germinación.....	75
5.	Efecto de la intensidad de la luz durante la germinación y desarrollo de las plántulas.....	77
6.	Generación <i>in vitro</i> de protocormos somáticos (clorofílicos) de <i>Govenia capitata</i> a partir	

de tejido calloso.....	79
7. desarrollo de la plántula.....	85
8. Desarrollo ontogénico.....	86
VIII Conclusiones.....	90
IX Bibliografía.....	93
X. Anexo 1.....	103
Anexo 2	108



I. RESUMEN

Govenia capitata es una orquídea terrestre endémica de México, la cual está poco estudiada. En este trabajo se pretendió conocer los eventos morfogénicos que se suceden durante la germinación, desde semilla hasta la formación de una planta completa.

Para inducir la germinación se probaron diferentes medios nutritivos y fuentes de carbohidratos. Se determinaron y describieron las etapas de desarrollo ontogénico que se presentan desde el inicio de la germinación hasta la formación de plantas completas. Finalmente, se eligió el medio de cultivo que indujo un mejor y más rápido desarrollo *in vitro* de las plantas.



II. INTRODUCCIÓN

Dentro de las monocotiledóneas se encuentra la familia Orchidaceae que está compuesta de aproximadamente 30 000 especies y 900 géneros por lo que es reconocida como la más numerosa del reino vegetal (Arditti, 1992).

Las orquídeas tienen un amplio rango de distribución, y se encuentran en zonas templadas y tropicales en todo el mundo entre 68° de latitud norte y 56° latitud sur a excepción de las zonas de hielo y de desierto (Caneva, 1978; Barba, *et al*, 2002). En México las podemos encontrar principalmente en los estados de Veracruz, Oaxaca, Chiapas, Guerrero, Morelos, México, Michoacán, Puebla y San Luis Potosí a una altitud desde el nivel del mar hasta los 4000 m.s.n.m. (Wright, N. P. 1958; Barba, *et al*, 2002).

Las orquídeas son plantas herbáceas con tallo o sin tallo, estas últimas se caracterizan por tener estructuras de almacenamiento llamadas pseudobulbos. Las orquídeas tienen diferentes hábitos de crecimiento como el epifito, terrestre, litofítico, palustre o subterráneo. (Caneva, 1978).

Pueden tener dos formas de crecimiento, la monopodial donde el tallo es simple con un crecimiento vertical y la simpodial donde el tallo modificado tiene un crecimiento horizontal y en este tallo modificado o rizoma se forman ápices que darán origen a otros tallos con crecimiento vertical (Fanfani y Rossi, 1988).

Los tallos y pseudobulbos de las orquídeas tienen una gran variedad de formas y tamaños que hacen que exista una gran diversidad morfológica de estas, así como también presentan una extensa variedad de flores, que se caracterizan por tener tres sépalos, tres pétalos, donde uno de los pétalos en general es más grande y ornamentado que los otros dos. Una vez que las semillas de orquídeas han madurado, necesitarán una simbiosis con un hongo para poder germinar, ya que éste le proporcionará los carbohidratos necesarios durante su desarrollo para transformarse en una plántula autótrofa. Aunque se tienen reportes (Gordon, 1990; Rasmussen, 1995; Barba, *et al*, 2002) de que algunas especies pueden germinar con sólo la presencia de agua y sobrevivir varias semanas sin recibir ningún nutrimento.

En las plantas el almidón es un carbohidrato metabólicamente activo y es la principal forma de almacenar reservas (Davis, *et al*, 1969). El almidón es muy abundante en los órganos de reserva como los cotiledones de las semillas, tubérculos y bulbos (Devlin, 1980) y es fundamental para la germinación. Las semillas de las orquídeas carecen de reservas de almidón pues no presentan cotiledones ni endospermo, de aquí la necesidad de una fuente externa de carbohidratos para su germinación.

En este trabajo se realizó el estudio de la inducción de la germinación asimbiótica *in vitro* de la especie de orquídea terrestre *Govenia capitata*.



III. MARCO TEÓRICO

1. Estructura de las semillas de orquídea

Las semillas de las orquídeas terrestres presentan un embrión simple, de forma elipsoidal que al madurar aún se encuentra indiferenciado y en la epidermis y parénquima contiene como reservas, lípidos y proteínas, sin embargo carece de almidón aunque se pueden encontrar algunas trazas (Arditti, 1992; Richardson *et al*, 1992; Barba, *et al*, 2002).

Un fruto (cápsula) de orquídea llega a contener hasta 4,000 000 de semillas (Arditti, 1992), dependiendo de la especie, y llegan a medir de 0.07-0.4mm de ancho y 0.11-1.97mm de largo incluyendo la testa (Rasmussen, 1995). El embrión de las orquídeas no contiene endospermo ni cotiledones y se encuentra dentro de una testa que tiene un gran espacio aéreo que le permite desplazarse grandes distancias por medio del viento (Arditti, 1992).

Las orquídeas pueden presentar poliembriónía (dos o más embriones en una semilla) o apomixis en algunas especies de forma natural (Arditti, 1992).

Las semillas de orquídeas pueden sobrevivir por largos periodos de tiempo si se almacenan correctamente como lo demostraron Shoushtari y colaboradores donde después de 20 años aún tenían

viabilidad las semillas de *Cattleya* conservadas en cloruro de calcio como desecante a una temperatura de 4° C (Hicks ,2000).

1. 1 Papel del hongo simbiote en la germinación de orquídeas

Germinación

La germinación de las orquídeas se define como “los estadios secuenciales del proceso de desarrollo del protocormo, terminando cuando se forman las hojas y raíces”. Para que ocurra la germinación, las semillas absorben agua a través de la testa lo que conlleva a un aumento de volumen y seguido por división celular en la región anterior, provocando la ruptura de la testa, dando lugar a una estructura cónica o esférica llamada protocormo, en el cual se forma en la región apical una protuberancia llamada primordio foliar, evento seguido de la formación de rizoides alrededor de la parte inferior del protocormo. A partir del primordio foliar se desarrollan las hojas fotosintéticas y en la parte basal del protocormo se forman las raíces, formando así una planta completa (Barba, *et al*, 2002).

1. 1.1 Germinación simbiótica

Las semillas de las orquídeas al no poseer reservas en sus semillas, establecen para lograr su germinación, una relación simbiótica con un hongo del género *Rhizoctonia*, aunque muchas especies pueden tener interacción simbiótica con otras variedades de hongos, la simbiosis es de tipo endofítico. La finalidad de la simbiosis es que el hongo proporcione los azúcares necesarios para la

germinación, principalmente durante el desarrollo del protocormo que es el estado intermedio entre el embrión indiferenciado y la plántula (Withner, *et al*, 1985; Richardson, *et al*, 1992).

D.G. Downie en 1940 realizó un estudio donde puso a germinar semillas de *Goodyera rapens* en el medio de cultivo "Pfeffer" con la adición del hongo micorrízico donde se obtuvieron buenos resultados que mejoraron al adicionar un azúcar, sin embargo, no se obtuvieron respuestas en ausencia de la micorriza (Arditti, 1984).

Rasmussen y Whigham en 1993 describen un método para la inoculación de micorrizas en semillas de 15 especies de orquídeas terrestres, (*Corallorhiza odontorhiza*, *Goodyera pubescens*, *Liparis lilifolia*, *Tripularia discolor* y *Galearis spectabilis*), el método consistió en colocar semillas de cada especie entre dos cuadros de malla de plástico con poro de 35 μm , que se sujetaron con un marco de plástico donde se colocaron semillas en el centro y se cubrieron con la misma tela, se sujetaron con un marco de plástico y fueron enterrados en tres localidades del bosque. Después de 12 meses las semillas de *Liparis* y *Tripularia*, no fueron micorrizadas y las semillas de *Goodyera* sí germinaron. Las semillas de *Galearis* germinaron a las 23 semanas y a las 62 semanas ya se observaron plántulas lo que indica que sí hubo micorrización. Las semillas de *Corallorhiza* no germinaron en todos los sitios, lo que indicó la especificidad de la micorriza con la orquídea (Rasmussen, y Whigham ,1993).

La germinación está directamente relacionada con la simbiosis orquídea-micorriza como lo reporta el trabajo realizado por Kinderen,

quién realizó estudios de la germinación de las orquídeas terrestres, *Dactylorhiza maculata* y *Epipactis helleborine*; Las semillas fueron colocadas dentro de pequeños sobres de plástico (que permitían la entrada de la micorriza hacia las semillas), y se colocaron en tubos con suelo donde se encontraba la micorriza. Observó que únicamente las semillas de *Dactylorhiza maculata* germinaron después de tres meses y medio; mientras que, después de nueve meses las semillas de *Epipactis helleborine* no germinaron y no se encontraron rastros de la micorrización. No fue sino hasta los 15 meses que se obtuvieron algunas semillas germinadas (Kinderen, 1995).

La simbiosis del hongo micorrizico con las orquídeas no ha sido completamente estudiada principalmente en las especies terrestres. En Costa Rica se estudió la actividad micorrizica con semillas de 24 especies de orquídeas epífitas y terrestres nativas, encontrando que todos los individuos de las especies terrestres fueron micorrizados y que solo algunos de los individuos de las plantas epífitas tenían micorriza (Rivas, *et al*, 1998).

Markovina y McGee en el 2000 compararon la germinación asimbiótica y simbiótica de semillas del género *Sarcochilus*. El estudio consistió en coleccionar plantas para extraer los pelotones (micorrizas) de las raíces, obteniendo cuatro especies de micorriza, de las cuales solo tres indujeron la germinación de las semillas de *Sarcochilus olivaceus* y de *Sarcochilus fitzgeraldii*. En la germinación asimbiótica se utilizó un medio de cultivo comercial (no especificado), en donde las plántulas desarrolladas tenían la misma talla que las obtenidas simbióticamente pero con las hojas y raíces más pequeñas (Markovina y McGee 2000).

La relación simbiótica de las orquídeas terrestres es fundamental para la germinación ya que durante los estadios tempranos del ciclo de vida de la planta el protocormo se encuentra enterrado y por consiguiente no puede producir su propio alimento debido a que no realiza fotosíntesis. Situación contraria en el caso de las plantas epífitas donde el protocormo sí realiza fotosíntesis por su ubicación aérea, aunque ésta no es eficiente, por lo cual también depende de la inoculación de la micorriza para poder germinar. (McKendrick, 2000).

Yoder y colaboradores enfatizaron la importancia de la micorriza ya que esta se encarga de transportar agua además de tener la función de nutrir al embrión (Yoder, *et al*, 2000).

1.1.2. Germinación asimbiótica

Lewis Knudson fue el primer investigador en dar a conocer la técnica *in vitro* del cultivo asimbiótico de orquídeas, él realizó un estudio acerca de la germinación de especies de los géneros *Cattleya*, *Laelia* y *Epidendrum* en el medio de cultivo Pfeffer modificado (solución B), que posteriormente se le conocería con el nombre de Knudson "B", mas adelante vuelve a hacer modificaciones al medio Knudson "B", agregando nuevos componentes y dejando la sacarosa como carbohidrato. A este medio de cultivo modificado le llamó Knudson "C" y en la actualidad es ampliamente utilizado de forma generalizada para la germinación asimbiótica de semillas de orquídeas *in vitro* (Arditti, 1972).

En 1966 Smith identificó micelios de *Rhizoctonia repens* en protocormos de *Dactylorhiza purpurela* y Hadley en 1969, confirmó que la celulosa era utilizada para el desarrollo de *Dactylorhiza purpurela*, *Goodyera repens* y *Spathoglottis alicata* en plantas inoculadas por el hongo micorrízico y observó que se desarrollaban mejor en medios de cultivo que contenían glucosa (Arditti, 1982).

En 1979 Ichihashi realizó estudios de germinación asimbiótica en las especies *Bletilla estriata*, *Dendrobium nobile*, *Cimbidium sensations*, *C. pumilum* var. *album*, *Paphiopedilum insigne* var. *Sanderæ* y *Dortaenopsis* con los medios de cultivo "Knudson", "Vacin y Went", "Kano" y "Thompson" donde observó que las especies *Bletilla estriata* y *C. sensations* registraron un alto índice de germinación en el medio Knudson en comparación con los otros medios y las otras especies (Ichihashi, 1979).

En 1981 Henrich y colaboradores realizaron la germinación de 17 especies de orquídeas terrestres en el medio de cultivo Norstog, en el cual germinaron 16 especies y posteriormente formaron protocormos, raíces y brotes, pero *Cypripedium calceolus* no mostró desarrollo de protocormos. (Henrich, *et al*, 1981).

Una de las ventajas de la germinación asimbiótica *in vitro*, es la de reproducir miles de plantas en un medio ambiente artificial controlado, el cual se puede modificar de acuerdo a las necesidades particulares de cada especie.

Rubluo y colaboradores reportan (1989) la germinación *in vitro* de *Bletia urbana* en el cual germinan semillas en los medios de cultivo Knudson, "C" y Murashige y Skoog modificado con las vitaminas de Gamborg, Miller y Ojima llamándole OMS. Donde adicionaron diferentes concentraciones de sacarosa (2.0, 3.0, 4.0 %), a diferentes condiciones de iluminación, 1200lux durante 16hrs a 25 °C, 3000 lux continuos a 28°C y a 1600 lux durante 16hrs con 30 °C, observaron que en el medio Knudson "C" con 2.0 % de sacarosa a 1200 lux durante 16 hrs. con 25 °C se obtuvo el mayor porcentaje de germinación (78 %) en relación al otro medio y a las otras pruebas (Rubluo, *et al*, 1989).

Pauw y Remphrey estudiaron la germinación bajo condiciones de frío semillas de tres especies de *Cypripedium* en el medio modificado Norstog, obteniendo que *C. reginae* germinó a las cuatro semanas y *C. parviflorum* germinaron a las ocho semanas, y en los tres casos continuaron el desarrollo de los protocormos (Pauw, 1993).

McKinley y Camper, llevaron acabo la germinación de *Goodyera repens* var. *Ophioides* (especie terrestre), con el medio nutritivo Murashige y Skoog adicionado con papa-dextrosa-agar (Difco), resultando efectivo para la inducción de la germinación de especies terrestres (Mc.Kinley, 1997).

Fumiaki y Koujirou reportaron el análisis de absorción de los elementos inorgánicos y azúcares en un medio líquido donde colocaron cuerpos parecidos a protocormos (PLB por sus siglas en inglés “protocorm like body”), de *Dendrobium moniliforme* Sw y *Darwinara* Pretty Girl. Ellos identificaron los compuestos iónicos de amonio, potasio, calcio magnesio, cloro, nitrato, fosfato, sulfato, sacarosa, fructosa, sorbitol y manitol además midieron el pH y la presión osmótica. Encontraron que en ambas especies se obtuvo una absorción total del ión sulfato, lo que sugiere que durante el cultivo de los PLB es un ión necesario para la micropropagación y observaron diferentes grados de absorción del resto de los compuestos estudiados. Los que se absorbieron en menor cantidad fueron los iones de calcio y magnesio en *Dendrobium* y en *Darwinara* los iones de cloro, nitrato y fosfato. También observaron que el nitrato se requería en más cantidad que el amonio en *Dendrobium* y que ocurría lo contrario en *Darwinara*. La glucosa se encontró completamente hidrolizada al final del período de cultivo. Finalmente observaron que otros tejidos en cultivo tardan tres o cuatro semanas en absorber completamente todos los iones y con PLB son absorbidos después de un mes (Fumiaki y Koujirou 1997).

Stemberg y Kane obtuvieron la germinación *in vitro* de *Encyclia botaina* var. *Erythronioides* en cuatro diferentes medios de cultivo, (Knudson “C”, Murashige y Skoog, Lindemann, Vacin y Went), donde se mostró que en los medios Knudson “C” y Murashige y Skoog se generaron protocormos verdes, y en los medios Lindeman y Vacin y Went, se encontraban éstos completamente cloróticos y solo

sobrevivieron el 3.0 y 1.0 % de los protocormos respectivamente, contrario a los otros dos medios de cultivo donde sobrevivieron mas del 90 % y finalmente, se desarrollaron en plántulas (Stemberg, 1998). Es importante señalar que no existen reportes de estudios acerca de la germinación *in vitro* de *G. capitata*.

1.2 Tiempo de germinación

El tiempo de germinación de las semillas de orquídea en la naturaleza es muy variable dependiendo de las especies y del tiempo que tarda la penetración de la micorriza. Se ha encontrado que el rango de germinación *in vitro* de las orquídeas está entre 7 y 235 días después de haberlas colocado en un medio de cultivo, y la obtención de plántulas tarda entre los 50 y 724 días, tiempo que dificulta la investigación de la germinación (Arditti, 1992).

Gayá en 1995 agregó kinetina a los medios de cultivo Knudson "C" y Murashige y Skoog y observó que las semillas de *Bletilla estriata* germinaron a los 7 días y *Spiranthes spiralis* a los 30 días. Las especies *Limodorum abortivum*, *Ophrys bombyliflora* y *Serapias parviflora* germinaron hasta los seis meses (Gayá, 1995).

Rasmussen en 1998 determinó el tiempo de germinación *ex vitro* e *in vitro* de las orquídeas terrestres *Goodyera pubescens* y *Corallorhiza odontorhiza* las cuales tardan entre 24 y 30 semanas en germinar, *Epipactis helleborine* (32 semanas), *Dactylorhiza maculata* (14 semanas), *Microtis pasiflora* (12 semanas), *Spiranthes sinensis* var.

Amoena (8 semanas) y *Bletilla estriata* (6 semanas), esto se debe a la especificidad de la micorriza en cada especie, así como de los requerimientos de nutrimentos que tiene la orquídea (Rasmussen, 1998).

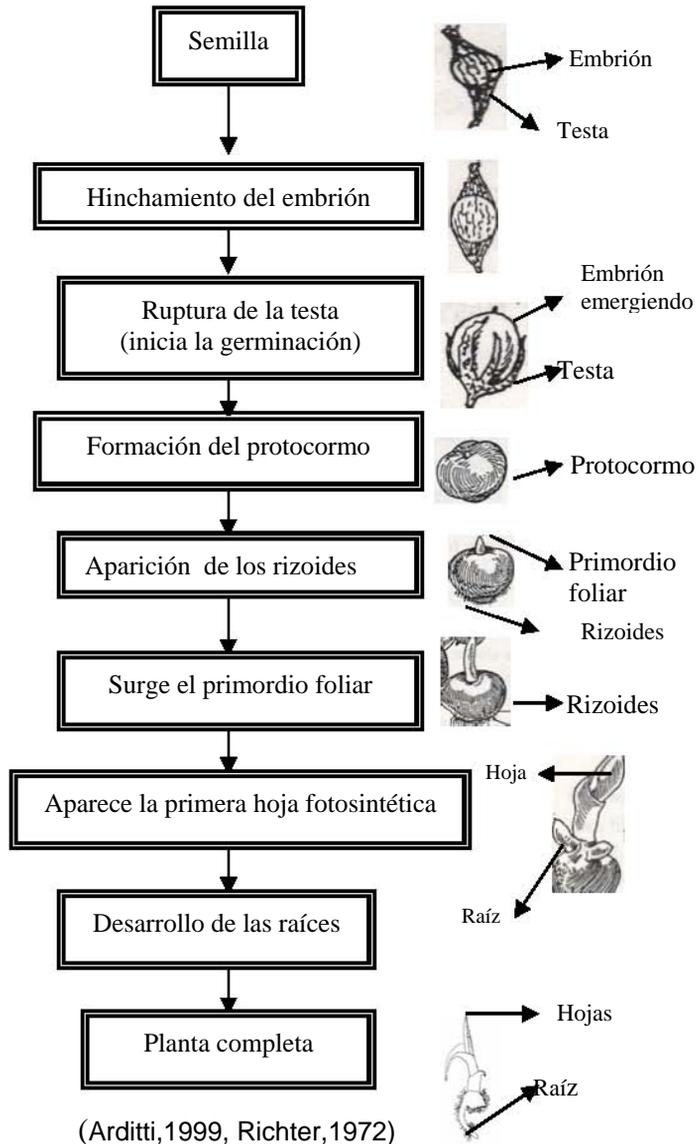
1.3 Desarrollo ontogénico (semilla – planta)

Una vez que las semillas germinan se origina una estructura conformada de células indiferenciadas llamada protocormo, el cual continúa su crecimiento a lo largo de varios meses o años, esto dependiendo de la especie, hasta alcanzar la edad adecuada para formar raíces y hojas y constituir así una planta completa. (Mc Kendrick, 2000).

El desarrollo de las plantas de las orquídeas difiere un poco entre las especies terrestres y epífitas de la siguiente manera: en general la germinación de las orquídeas terrestres (ver diagrama de secuencia 1), comienza con el incremento en volumen del embrión y la ruptura de la testa, seguido de la formación del protocormo, posteriormente ocurre la aparición de rizoides que absorberán los nutrientes y agua del medio en que se encuentran, y después se forma una elevación en la región apical del embrión (primordio foliar), la cual continuará su desarrollo para formar la primera hoja fotosintética, posteriormente se desarrollan las raíces para conformar a una planta completa.

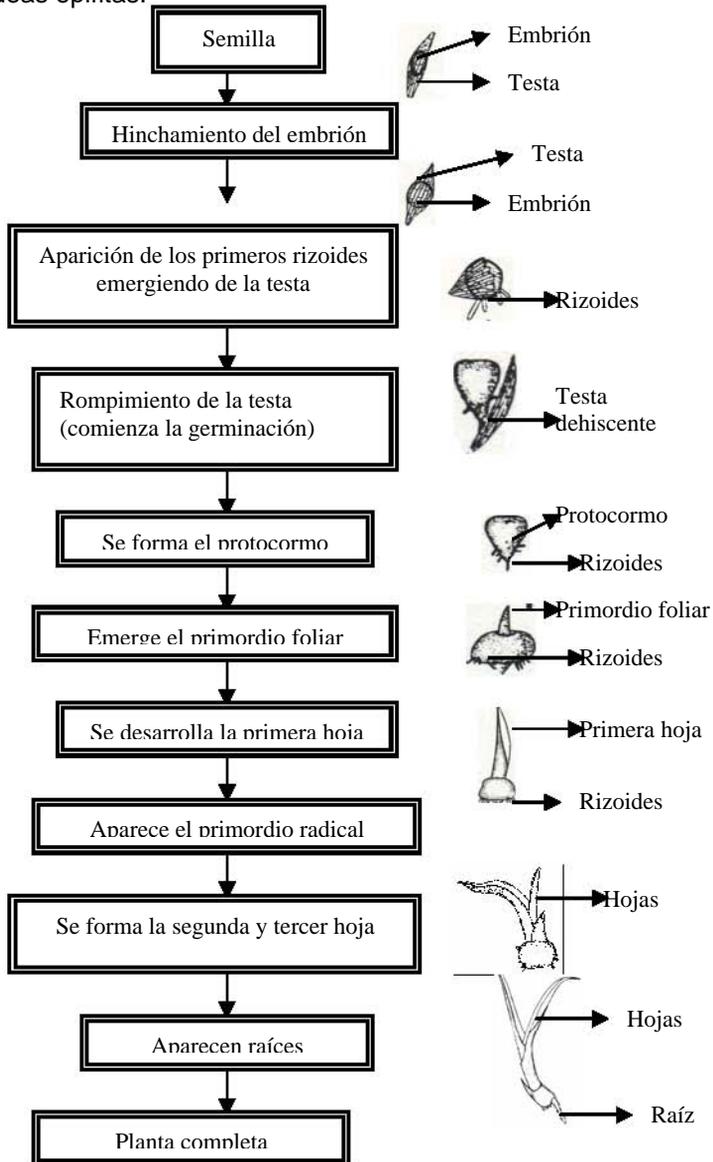
Diagrama 1

Secuencia del proceso de germinación de orquídeas terrestres.



En el caso de las orquídeas epífitas (diagrama de secuencia 2), la germinación inicia al hincharse el embrión, posteriormente, aparecen los primeros rizoides en la base del embrión que emerge de la testa, después se forma el protocormo donde se observa la presencia del primordio foliar, continúa el desarrollo de dicha estructura para formar la primera hoja fotosintética, luego se forma el primordio radical, seguido de la formación de la segunda y tercer hoja, continuando con la emergencia de raíces para obtener una planta completa.

Diagrama 2. Secuencia de desarrollo del proceso de germinación de orquídeas epifitas.



1.4. Factores que afectan la germinación

La mortandad en los primeros estadios del desarrollo del protocormo es común en todas las especies de orquídeas y puede deberse a la sensibilidad luminosa, al inadecuado balance de nutrimentos, temperaturas extremas, hormonas o mezclas de gases (CO₂-O₂-N₂) que necesitan los protocormos subterráneos y que se encuentran en diferentes proporciones en los suelos orgánicos.

La luz es un factor importante en la germinación puesto que en muchas plantas puede actuar como inhibidor o estimulante dependiendo de la intensidad y de la especie.

La luz aparentemente es necesaria para el desarrollo de los protocormos de orquídeas terrestres, sin embargo inhiben la germinación y el desarrollo del protocormo en las especies *Gymnadenia conopsea* y *Cipripedium irapeanum* entre otras. Por lo que para germinar necesitan estar en oscuridad o con baja iluminación y más tarde cuando se forman las primeras hojas, disminuye la sensibilidad a la luz (Withner y Krieger, 1985).

1.5. El papel de los carbohidratos en la germinación de las orquídeas

En 1922 Knudson reporta la importancia de la sacarosa en la germinación de las orquídeas al descubrir que las semillas de

Laeliocattleya no germinaron en el medio de cultivo que no contenía el azúcar. Además reportó el efecto de varios azúcares y sus

Susana Padrón Hernández

concentraciones en la inducción de la germinación de orquídeas (Arditti 1972).

En 1970 Ernst, Arditti y Healy, establecieron que algunos azúcares como la xilosa, fructosa y sacarosa son favorables para la germinación *in vitro* de las orquídeas. Sin embargo, demostraron que la galactosa actúa como inhibidor ya que resultó tóxica para las plántulas aún en bajas concentraciones porque interfiere en la síntesis de celulosa y de hexoquinasa (Withner y Krieger, 1985; Arditti, 1984).

Ernst y colaboradores en 1971 trabajando con *Phalaenopsis* cv. germinaron semillas en el medio nutritivo Knudson "C" al que le adicionaron diferentes tipos de azúcares, como los monosacáridos: D-Glucosa, D-Fructosa, D-Galactosa, disacáridos: sacarosa, maltosa, celobiosa, trealosa, melibiosa y lactosa y los trisacáridos: rafinoza, melezitosa, y almidón; encontrando que con la D-Galactosa se inhibe la germinación, mientras que el mejor desarrollo de plántulas completas se obtuvo en presencia de sacarosa, maltosa, celobiosa, trealosa, rafinoza y melezitosa en concentraciones de 2.0 % (Ernst, 1971).

Se ha determinado que los carbohidratos que producen las micorrizas del género *Rhizoctonia* son manitol, trealosa y glucosa. El manitol se encuentra presente normalmente en las hojas de *Bletilla hyacinthina* así como también la trealosa y glucosa (Smith y Smith, 1973).

Harrison y Arditti en 1978 reportaron que las semillas de *Cattleya aurantiaca* germinaron en medio de cultivo que contenía sacarosa y un mes después fueron capaces de llevar a cabo la fotosíntesis en un medio carente de ella. (Arditti, 1984).

En 1984 Arditti mencionó con respecto los polisacáridos, que muchas especies de orquídeas no germinan o no crecen bien en presencia de celulosa o almidón. Con especies de *Miltonia* y *Odontoglossum* reportó que con el 1.0 % de almidón se presentaron muy buenos resultados de germinación pero que probablemente se dieron debido a las impurezas que éste tiene como son la maltosa y la glucosa. También mencionó que la presencia de azúcar en el medio puede determinar el desarrollo de las estructuras de la planta, por ejemplo *Cattleya aurantiaca* en el medio Knudson "C" sin sacarosa, formó plántulas sin raíces y al transferirlas a un medio con sacarosa formó plántulas completas. Es importante mencionar que la sacarosa es utilizada en cultivo *in vitro* con mayor frecuencia debido a que soporta la esterilización en autoclave (Arditti, 1984).

Mas tarde en 1992 St. Arnaud y colaboradores estudiaron la germinación de *Cypripedium acaule*, especie terrestre, con el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), y como fuentes de carbono glucosa y extracto de papa (Difco). Ellos reportaron que la germinación comienza entre los tres y seis meses según sea el estadio de maduración de las cápsulas. (St-Arnaud, 1992).

Las concentraciones del carbohidrato también pueden determinar el porcentaje de germinación, tal es el caso de *Bletilla striata* que al agregar 10 g/l de sacarosa al medio de cultivo Murashige y Skoog se incrementa el porcentaje de germinación y al agregar 20 g/l se reduce (Keun y Young, 2000).

Se ha identificado que *Cymbidium* se desarrolla mejor con sacarosa, maltosa, glucosa y fructosa, aunque la glucosa inhibe la multiplicación de protocormos de algunas especies de este mismo género. En el caso de los géneros *Dendrobium* y *Aranda*, estos responden mejor en los medio de cultivo que contienen fructosa. y el callo de *Aranda* se desarrolla mejor en presencia de glucosa (Hew y Yong, 2004).

La sacarosa es un disacárido compuesto por glucosa y fructosa, en las plantas funciona como material de reserva y es el componente más utilizado por las células para la formación de moléculas orgánicas necesarias para su desarrollo, en especial si la fotosíntesis no es eficiente. Además, es la principal forma de transporte de los glúcidos a través de las plantas superiores (Devlin, 1980).

La maltosa es un disacárido no reductor compuesto por dos moléculas de glucosa (α - D-glucopiranososa -1:4-D-glupiranosica) y es un producto de la degradación parcial del almidón siendo abundante en los cereales germinados ya que durante la germinación, el almidón se degrada en unidades de maltosa que a su vez se degradan en

unidades simples de glucosa necesarias para alimentar al embrión (Peña, 2002, [www.2](#)).

El almidón es producto de la transformación de los glúcidos durante la fotosíntesis. Éste se deposita en las plantas en forma de gránulos y es abundante en los órganos de reserva como las semillas, tubérculos y bulbos principalmente, donde desempeña el papel de reserva energética para el desarrollo y crecimiento de la planta (Devlin, 1980).

1.6 El papel de los extractos naturales en la germinación de las orquídeas

El uso de extractos naturales ha sido muy exitoso debido a su composición química, tal es el caso encontrado por Arditti (según Withner y Krieger, 1985), el cual reportó que el extracto de plátano contiene citocininas, auxinas, giberelinas, biotina, minerales y aminoácidos por lo que promueve la germinación. Así como el extracto de tomate promueve el crecimiento de raíces. Los extractos más utilizados en la germinación de orquídeas son los de plátano, tomate, papa, jugo de piña, miel y el endospermo líquido de coco (Withner y Krieger, 1985).

Goodyera rapens (especie terrestre) germinó con extracto de papa y 1.0 % de glucosa en medio Pfeffer (Arditti, 1984).

Withner 1985, menciona que Murashige y Kotomori en 1965 encontraron que el endospermo líquido de coco inhibe la germinación en *Dendrobium*, pero es estimulante en otras especies de orquídeas.

Obaidul y colaboradores estudiaron el efecto de los extractos naturales en la germinación de *Cattleya*, donde adicionaron al medio de cultivo extracto de papa, plátano, alubia y de soya. En todos los casos a los 10 días se presentaron los embriones verdes y a las 10 semanas estos desarrollaron brotes. Posteriormente, se observó que el extracto de papa indujo que los protocormos tuvieran una mayor talla, y un mejor crecimiento de las plántulas. Sin embargo el extracto de alubias y de soya dio como resultado plántulas de talla más grande y con mayor número de estructuras (Obaidul, 2000).

Posteriormente Brundrett y colaboradores, mencionan que para las orquídeas terrestres tolerantes al frío se recomienda utilizar componentes complejos que benefician la germinación, por ejemplo el cultivo *in vitro* con cubos de papa (Brundrett, *et al*, 2001).

2 Género *Govenia*

2.1 *Govenia capitata* Lindley.

El género *Govenia* está representado por 35 especies distribuidas dentro de las áreas tropicales y de bosque pino - encino en todo el mundo. Crece en lugares húmedos, pedregales o a las orillas de cañadas y barrancas, cerca de riachuelos o cerca de hilos de agua temporales (Hagsater, 1972; www.1.)

Las especies del género han sido poco estudiadas y los trabajos realizados principalmente son de tipo taxonómico (Dressler, R.L. (1981), y de distribución (Greenwood, 1992), y no se han reportado investigaciones acerca de su fisiología, ni de su germinación *in vitro* o *ex vitro*. Nuestro país posee una serie de representantes de este género y entre ellas se encuentra *Govenia capitata*, que es una planta terrestre endémica de México y que se encuentra distribuida en los estados de Hidalgo, México, Michoacán, Morelos, Oaxaca y muy probablemente en Guerrero y Puebla (ver mapa), a una altitud entre los 2000-3000 m.s.n.m. en bosques de pino-encino y en suelos donde abunda la tierra de hoja o humus (Dressler, 1972). Por lo anterior es importante realizar estudios acerca de la morfofisiología de este género y en particular de la especie *Govenia capitata*.



■ Estados donde habita la orquídea terrestre *Govenia capitata*.

2.1.2 Descripción de la planta

Sinonimia: *Govenia andrieuxii* Rchb.f.

La planta mide aproximadamente 90 cm. de alto, con dos hojas anchas plegadas, una con pecíolo tubular que cubre a la hoja interior ubicado en la parte inmediata superior del pseudobulbo. Los pecíolos se encuentran cubiertos por vainas tubulares.

Govenia capitata es una planta terrestre, que tiene dividido su ciclo de vida en dos periodos, en el primero se produce la floración y termina con la formación de las semillas en la época de lluvias, y el segundo periodo es cuando se encuentra en reposo durante la época de sequía y no es conspicua en campo (Hagsater, 1972).



Planta adulta de *Govenia capitata*

El pseudobulbo tiene una forma larga subglobosa irregular y carnosa, de color blanquecino, café pálido o verde si es grande, y cuenta con aproximadamente seis internodos.

Las raíces se encuentran en la base del pseudobulbo, puede llegar a tener entre 15 a 20 raíces con una longitud de 15 cm. de largo y 2 mm de ancho.

La inflorescencia tiene una forma subcapitada que contiene de 15 a mas flores resupinadas que se encuentran en una posición horizontal, cada flor mide 4 cm. de alto, 3 cm. de ancho y 5.5 cm. de largo incluyendo el ovario, son de color blanco con marcas de color amarillo cromo en el labelo. Su época de floración está entre los meses de junio- agosto.



Inflorescencia de *Govenia capitata*

La cápsula es de forma cilíndrica sub-ovoide con seis costillas, mide 5 cm. de largo y 1.7cm de ancho, es de color rojo púrpura oscuro

y tiene una superficie lustrosa. La cápsula madura cuatro meses después de la polinización (Greenwood, 1992).

Se ha observado a las abejas del género *Euglossine* y a las abejas de miel (*Apis mellifera*) visitar esta especie lo cual indica que pueden ser los insectos polinizadores (Téllez, 2002; www.3).

2.1.3 Clasificación taxonómica

Reino	Plantae
Filo	Liliopsida
Orden	Orchidales
Familia	Orchidaceae
Sub familia	Vandoideae
Tribu	Maxillarieae
Subtribu	Corallorhizinae
Género	<i>Govenia</i>
Especie	<i>capitata</i>

G. capitata está emparentada con las especies del género *Corallorhiza*.

(Dressler, 1981)

2.1.4 Usos

El género *Govenia* es utilizado por los Tzetzales (Chiapas) extrayendo la goma del corno para la construcción y reparación de instrumentos musicales (Téllez, 2002). Actualmente no se conoce ninguna otra aplicación utilitaria para la especie.



IV. Objetivos

Objetivo general

- Conocer el proceso de germinación asimbiótica *in vitro* de *Govenia capitata*

Objetivos particulares

- Conocer la respuesta de germinación asimbiótica de *G. capitata* en cinco medios de cultivo diferentes.
- Evaluar el desarrollo de los embriones inducido por el estímulo de tres diferentes fuentes de carbohidratos.
- Describir los eventos ontogénicos de *G. capitata* durante la germinación asimbiótica *in vitro*.
- Conocer el tiempo de duración de cada uno de los estadios ontogénicos que se presentan desde la germinación hasta la formación de la planta completa *in vitro*.



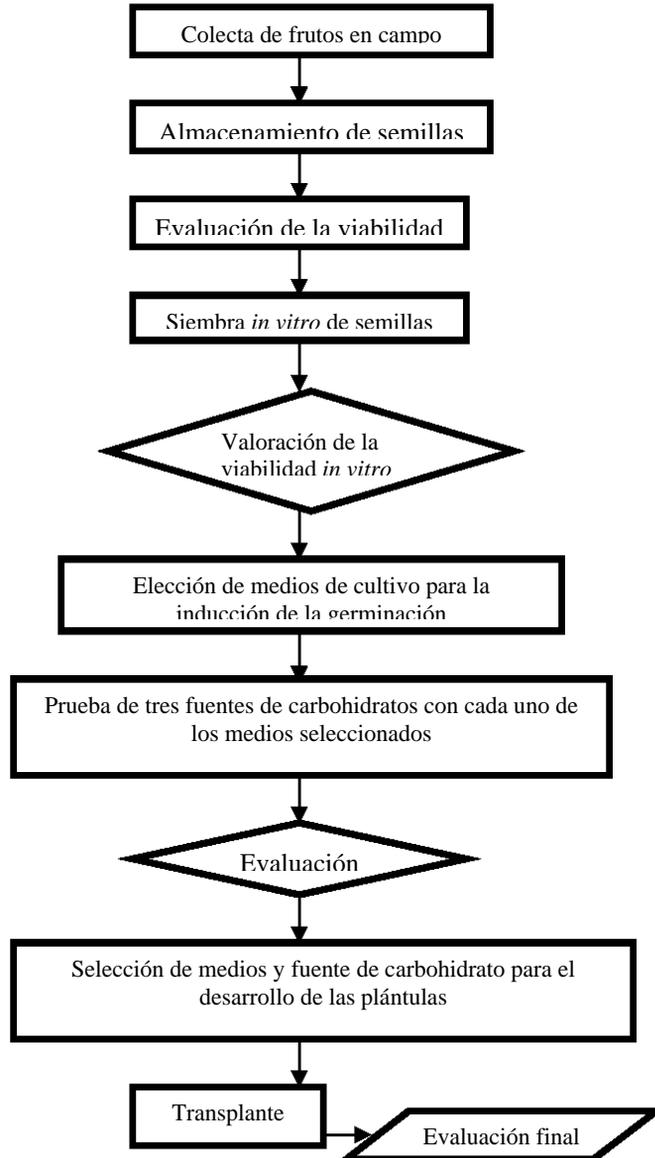
Metas

- Establecer el medio nutritivo más favorable para la inducción de la germinación asimbiótica *in vitro*.
- Establecer la fuente de carbohidrato que induzca la mejor respuesta de desarrollo del embrión y las plántulas *in vitro*.
- Obtener plantas completas de *Govenia capitata* mediante la germinación asimbiótica *in vitro*.



V. METODOLOGIA

Diagrama 3. Metodología general



Las semillas de *Govenia capitata* se obtuvieron de cápsulas maduras colectadas en campo de plantas silvestres sanas, provenientes del Parque Nacional “Iztaccihuatl – Popocatepetl, Zoquiapan y Anexas” ubicado al oriente de la cuenca de México en el área de confluencia de los estados de México, Puebla y Morelos, entre las coordenadas geográficas 18° 59' y 19° 16' 25" latitud norte y 98° 34' 54" y 98° 16' 25" longitud oeste. Se introdujeron las cápsulas en sobres de papel y se transportaron al laboratorio.

1. Almacenamiento de semillas

En el laboratorio, las cápsulas de *Govenia capitata* se colocaron en un sobre de papel y se introdujeron en un desecador que contenía cloruro de calcio anhidro, durante dos semanas. Una vez dehiscentes las cápsulas, se procedió a envasar las semillas en viales de vidrio con tapón de tela y almacenar en el desecador y en refrigeración a 7° C.

1.1 Desinfestación de semillas

Se elaboraron sobres de 2 cm. por lado de papel filtro y colocaron en ellos aproximadamente 100 semillas, se sujetaron con un clip para evitar la salida de las semillas. Posteriormente, se desinfestaron con etanol al 70% durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se decantó el etanol y agregó una solución de hipoclorito de sodio al 0.6% v/v (marca “Clorox”) durante 15 minutos en constante agitación. Se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces.

1.2 Evaluación de la viabilidad

Se preparó cloruro de trifeníl tetrazolio (TTC) a una concentración de 1.0% p/v y almacenó en refrigeración a 7° C.

Se tomaron dos sobres con semillas para realizar las pruebas de viabilidad, colocando éstos en una caja Petri con 10 ml de solución de TTC, 1.0 % p/v en oscuridad, y se evaluó la viabilidad cada 24 horas, durante tres días.

1.3 Siembra *in vitro* de semillas en cinco medios de cultivo

Se prepararon cinco medios de cultivo: Murashige y Skoog, SP 1, SP 2, Knudson "C" y Dixon, a los cuales se les adicionó como fuente de carbohidrato, sacarosa (ver anexo 1).

Una vez preparados los medios de cultivo, se procedió a desinfectar las semillas de la misma manera que para las pruebas de viabilidad, solo que los enjuagues se realizaron dentro de la campana de flujo laminar y con agua destilada estéril. Se sembraron dentro de la campana de flujo laminar previamente desinfectada con etanol al 70% y con hipoclorito de sodio al 0.6% v/v.

1.4 Siembra *in vitro*

Sobre la mesa de la campana de flujo laminar se colocaron dos mecheros Bunsen encendidos, un frasco de vidrio con algodón y alcohol al 70% y un par de pinzas de disección esterilizadas con las cuales se tomaron y abrieron cuidadosamente los sobres (con

semillas previamente desinfectadas), los cuales se colocaron dentro de los frascos con el medio nutritivo, se flameó la boca del frasco y se tapó con la tapa de plástico, después se selló con una película envolvente de papel plástico. Una vez sembradas las semillas se colocaron bajo dos intensidades luminosas, la mitad en luz directa (LD) con una intensidad luminosa de 1500 lux y la otra mitad en luz indirecta (LI) con una intensidad luminosa de 200 lux. Con un fotoperiodo de 16 hrs. de luz y 8 de oscuridad.

La luz provenía de seis lámparas de luz fluorescente blanca, fría.

1.5 Evaluación de viabilidad de las semillas en los medios de cultivo para la elección del mejor medio.

La viabilidad se evaluó a los 90 días de cultivo y se extrajeron las semillas de un frasco de cada tratamiento para colocarlas sobre papel filtro dentro de una caja Petri con 10 ml de cloruro de trifeníl tetrazolio (TTC), a una concentración de 1.0% p/v. La caja se puso en oscuridad y se evaluó la viabilidad de las semillas a los tres días, conociendo la viabilidad de las semillas, se eligieron los medios que contenían una viabilidad mayor.

1.6 Prueba de carbohidratos experimentales con cada uno de los medios seleccionados.

Se seleccionaron varios carbohidratos experimentales: maltosa (Difco), extracto de papa y maltosa - extracto de papa, los cuales fueron adicionados a los medios de cultivo donde se mostró una mayor viabilidad. A la preparación inicial solo se sustituyó durante su preparación la sacarosa por el carbohidrato experimental. Para la preparación de extractos de papa se pelaron 200g de papas blancas y se cortaron en trozos pequeños posteriormente se hirvieron en medio litro de agua destilada durante una hora, se filtró el líquido y se llevó a un litro. Este litro de extracto se utilizó para preparar un litro de medio. (Arditti, 1982)

Se realizó el transplante de las semillas, siguiendo las medidas de seguridad de siembra de semillas en la campana de flujo laminar.

Los frascos de cultivo con las semillas se colocaron en una cámara de incubación con luz proveniente de 6 lámparas de 75 w de luz fluorescente con una intensidad luminosa de 200 lux y con foto periodo de 16hrs luz y 8 de oscuridad.

1.7 Evaluación y selección del mejor medio y fuente de carbohidrato para el desarrollo de las plántulas.

Se observó el desarrollo de los protocormos en cada medio nutritivo con sus respectivas fuentes de carbohidrato a través del estereoscopio para identificar que medio nutritivo y carbohidrato

inducía en menor tiempo un mayor número de estructuras y así poder elegir el medio nutritivo y carbohidrato más eficiente para el desarrollo de las plántulas.

1.8 Evaluación de los eventos ontogénicos y tiempo de desarrollo.

Para evaluar cada uno de los eventos ontogénicos se tomaron registros cada catorce días, de cada uno de los eventos ocurridos en los medios de cultivo con los carbohidratos experimentales.



1.9 DISEÑO EXPERIMENTAL

1.9.1 Pruebas de viabilidad

Se utilizaron cien semillas para evaluar el porcentaje de viabilidad. Se observó cada 24 horas durante tres días o hasta que el valor fue constante. Se realizaron dos repeticiones.

Tabla 1. Repeticiones para la evaluación de la viabilidad

Tiempo de almacenaje	Número de semillas
7	200
21	200
35	200
49	200
63	200
77	200

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{Semillas teñidas}}{\text{Total de semillas}} \times 100$$

1.9.2 Siembra *in vitro*

Se realizaron 10 repeticiones de cada uno de los cinco medios de cultivo (ver tabla del anexo 1) y se evaluó la respuesta cada 14 días durante 3 meses. Cada repetición fue de 100 semillas.

Tabla 2. Prueba de germinación *in vitro* en diferentes medios y condiciones de cultivo

Medio de cultivo	Murashige Y Skoog	SP1	SP2	Knudson "C"	Dixon
Intensidad luminosa LD	1*	2*	3*	4*	6*
LI	6*	7*	8*	9*	10*

*Tratamientos con diez repeticiones y cada repetición con cien semillas

Una vez que se evaluó la respuesta en los medios de cultivo Dixon, Murashige y Skoog, SP1, SP2 y Knudson "C" que tenían como fuente de carbohidrato sacarosa se transplantó todo el material a los medios de cultivo SP1, SP2 y Knudson "C" sustituyendo la sacarosa por tres diferentes fuentes de carbohidratos: maltosa (20g/L), extracto de papa (1000 ml/L) y extracto de papa-maltosa (500 ml/L – 10 g/L), (ver tabla 3)

Tabla 3. Carbohidratos experimentales para la inducción de la germinación en dos condiciones de iluminación.

Medio Nutritivo	Knudson "C"		SP1		SP2	
Carbohidrato	LD	LI	LD	LI	LD	LI
Maltosa	1 *	2*	7 *	8*	13 *	14*
Extracto de Papa	3 *	4*	9*	10*	15 *	16*
Maltosa-EP	5 *	6*	11 *	12*	17*	18*

* Tratamiento con 10 repeticiones.

LD: Luz directa

LI: Luz indirecta

Transcurridos dos meses en cultivo se procedió a realizar un cambio a medio fresco, donde se transplantó todo el material con el tratamiento que tuvo una mejor y más rápida respuesta. La revisión del desarrollo de la plántula en este medio, se realizó cada catorce días durante 10 meses, evaluando la presencia de primordio foliar, número y tamaño de hojas y aparición de rizoides y de raíces.

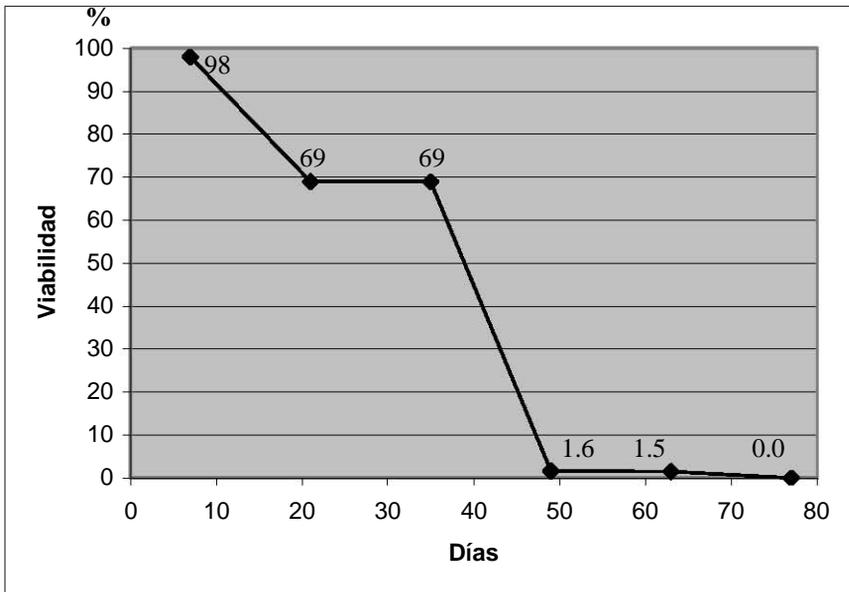


VI. RESULTADOS

1. Viabilidad de las semillas

La viabilidad de las semillas de *Govenia capitata* se evaluó cada siete días para saber la constancia o descenso de la viabilidad, observando una caída fuerte a los 49 días y finalmente se redujo la viabilidad a cero a los 77 días, como lo muestra la gráfica 1.

Gráfica 1. Viabilidad de semillas de *Govenia capitata* después de diferentes tiempos de almacenamiento.



1.1 Viabilidad de las semillas en los medios de cultivo

Para comprobar que las semillas de *Govenia capitata* sembradas en los cinco diferentes medios de cultivo eran aún viables se les realizaron pruebas tomando frascos con semillas al azar, encontrando que las semillas sembradas en el medio SP2 presentaban el 100% de viabilidad y las semillas del medio SP1 un 90 %. Las semillas sembradas en los medios Knudson "C" y Murashige y Skoog presentaron una viabilidad de 47.0 y 41.0 % respectivamente. Las semillas cultivadas en el medio nutritivo Dixon perdieron completamente la viabilidad (Tabla 4).

<i>Medio de cultivo</i>	<i>Viabilidad %</i>
SP2	100.0
SP1	90.9
Knudson "C"	47.0
Murashige y Skoog	41.0
Dixon	0.0

Tabla 4. Viabilidad de las semillas a los 120 días de iniciada la siembra en los diferentes medios de cultivo

Con base a estos resultados se eligieron los mejores medios de cultivo que fueron el SP2, SP1 y Knudson "C", debido a que mantuvieron una viabilidad mayor. Las semillas que se sembraron en el medio Murashige y Skoog se extrajeron de éste y se transplantaron a los medios de cultivo seleccionados Knudson "C", SP1 y SP2 con sus respectivas fuentes de carbohidratos.

A treinta días del trasplante de las semillas en el medio Knudson "C" adicionado con extracto de papa, se observó que los embriones habían roto la testa y estaban cubiertos de rizoides. Respuesta que no ocurrió en los otros medios de cultivo sino mucho después hasta los 210 días.

Entre los 210 y 240 días después del trasplante se observó la presencia de protocormos con rizoides en los medios SP1 y SP2 adicionados con maltosa, extracto de papa-maltosa y con extracto de papa. En el medio Knudson "C" con maltosa no hubo respuesta, sin embargo, en este medio adicionado con extracto de papa los protocormos tuvieron un crecimiento superior y desarrollaron una mayor cantidad de rizoides, en comparación a los otros medios. Por inducir un mejor y más rápido desarrollo se decidió transplantar todo el material a este medio.

A los 270 días de cultivo se observó que los protocormos formaron callo independientemente si recibían luz directa e indirecta.

A los 300 días de cultivo se observó que empezaron a diferenciarse protocormos a partir del tejido calloso, (tabla 4, grafica 2) estos presentaban una forma ovoide y con clorofila, alcanzando una longitud de 0.5 a 1.0 cm. En luz indirecta (LI), el crecimiento en algunos casos, fue con una orientación geotrópicamente positiva. En cultivo bajo luz directa (LD) los protocormos y el callo evidenciaron el inicio de necrosamiento.

Posteriormente (a los 330 días) se puso en evidencia la generación de 36 protocormos clorofílicos y con una longitud hasta de 1.0 cm. y en algunos casos, presentaron un crecimiento geotrópicamente positivo en cultivo bajo ambas intensidades luminosas. En LD las estructuras y el tejido calloso continuaron necrosándose, por lo que se decidió pasarlos de las condiciones de luz indirecta y así detener la mortandad.

A los 360 días de desarrollo se contabilizó la generación de 125 protocormos clorofílicos y fue evidente que la mortandad por necrosamiento se detuvo, disparándose la respuesta organogénica ya que treinta días después se habían generado 518 protocormos con clorofila y con una longitud máxima de 1.0 cm., pasando a 861 protocormos clorofílicos formados un mes después.

A los 450 días se observaron 1080 protocormos con clorofila, presentándose cambios morfológicos ya que algunos protocormos comenzaron a adquirir la forma de un rizoma, otros evidenciaron la generación de primordios de raíz y el desarrollo de raíces de más de un centímetro de longitud, y treinta días después las raíces siguieron

creciendo y por primera vez se hizo evidente el desarrollo de hojas de hasta 4.0 cm. de longitud

A los 540 días las raíces alcanzaron hasta 3.0 cm. de longitud y las hojas una longitud hasta de 12.0 cm.

A los 570 días se observaron 15 pseudobulbos con raíces con longitudes que iban entre los 0.3 a los 3.0 cm. y con un brote foliar entre los 0.3 a 15.0 cm.

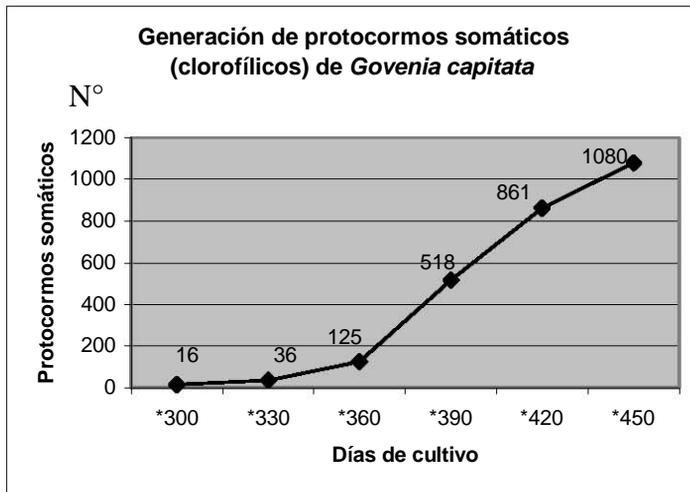
Para el día 690 las raíces median ya casi ocho centímetros de longitud.

2. Generación de protocormos

La generación de protocormos somáticos clorofílicos se originó a partir de tejido calloso a los 300 días de iniciado el cultivo *in vitro*, y se observó una generación de protocormos muy elevada hasta los 420 días, ocurriendo una vez que ya estaban transplantados en el medio de cultivo Knudson "C" adicionado con extracto de papa, como se muestra en la tabla 5 y gráfica 2.

Tabla 5. Generación *in vitro* de protocormos somáticos clorofílicos a partir de tejido caloso de *Govenia capitata* en Knudson "C" con extracto de papa.

<i>Días en cultivo</i>	<i>Protocormos somáticos generados</i>
300	16
330	36
360	125
390	518
420	861
450	1080



Grafica 2. Generación de protocormos clorofílicos de origen Somático de *G. capitata* en Knudson "C" con extracto de papa.

En la tabla 6 se muestra el momento en que se observó cada uno de los catorce estadios y el tiempo en que estuvo presente cada uno durante los 690 días que duró el estudio.

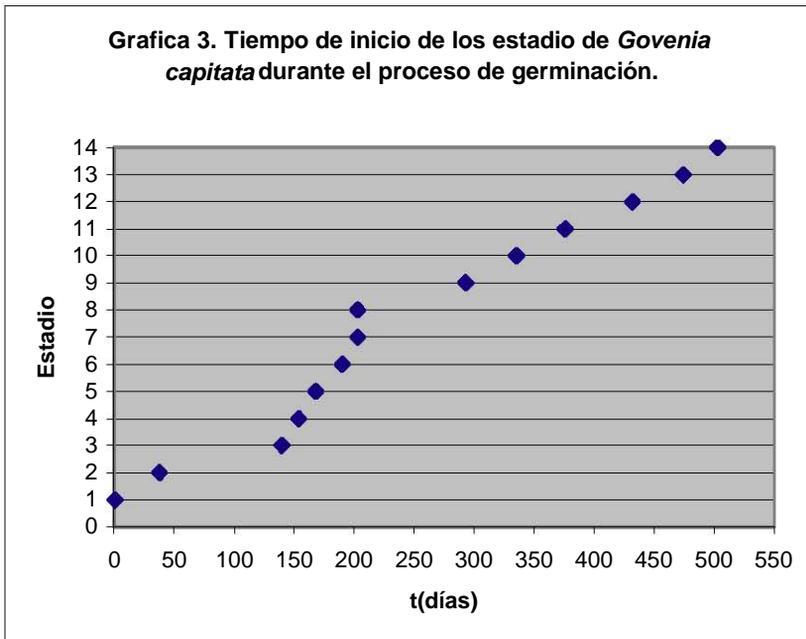
Tabla 6. Inicio y permanencia de los estadios de desarrollo ontogénico de *Govenia capitata* durante los procesos de germinación y postgerminativo.

No.	Estadio	<i>Días en los que se registró el estadio</i>							
1	Semilla	0	30	-	-	-	-	-	-
2	Embrión turgente	60	90	120	-	-	-	-	-
3	Dehiscencia de la testa	150	-	-	-	-	-	-	-
4	Protocormo clorótico fusiforme	150	180	210	240	-	-	-	-
5	Pseudobulbo clorofílico con rizoides	270	-	-	-	-	-	-	-
6	Pseudobulbo callogénico	270	-	-	-	-	-	-	-
7	Tejido calloso embriogénico	270	300	330	360	390	420	-	-
8	Pseudobulbo clorofílico	270	300	330	360	390	420	-	-
9	Pseudobulbo con cubiertas foliares	300	-	-	-	-	-	-	-
10	Pseudobulbo clorofílico sin rizoides	390	420	450	-	-	-	-	-
11	Generación de hojas	480	510	540	570	600	630	660	690
12	Pseudobulbo con raíces	480	510	540	570	600	630	660	690
13	Desarrollo foliar	-	-	-	-	-	-	660	690
14	Apertura de la lámina foliar	-	-	-	-	-	-	660	690

En la tabla 7 y grafica 3, se representan los días en que se inició, terminó y cuanto duraron los catorce estadios, mostrando claramente a cual de las doce rutas morfogénicas corresponde.

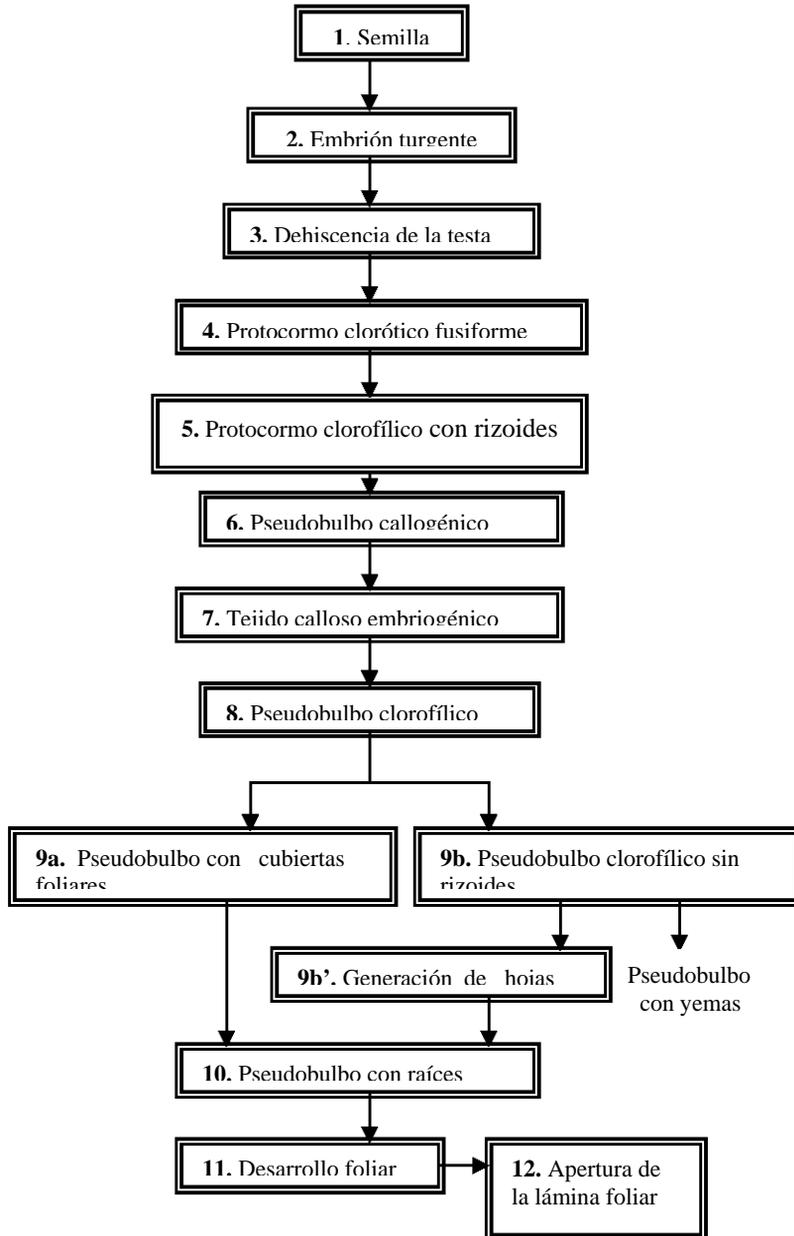
Tabla 7

N°.	Estadio	Estadio	Día en el que se inicia el cambio de estadio	Día en el que termina el cambio de estadio	Duración del estadio (días)
1	1	Semilla	---	38	38
2	2	Embrión turgente	38	140	102
3	3	Dehiscencia de la testa	140	154	14
4	4	Protocormo clorótico fusiforme	154	168	12
5	5	Pseudobulbo clorofílico con rizoides	168	190	22
6	6	Pseudobulbo callogénico	190	203	13
7	7	Tejido caloso embriogénico	203	420	217
8	8	Pseudobulbo clorofílico	203	420	217
9	9a	Pseudobulbo con cubiertas foliares	293	300	7.0
10	9b	Pseudobulbo clorofílico sin rizoides	335	450	115
11	9b'	Generación de hojas	376	690	314
12	10	Pseudobulbo con raíces	332	690	258
13	11	Desarrollo foliar	474	690	216
14	12	Apertura de la lámina foliar	503	690	187



Grafica 3 . Estadios. 1. Semilla, 2. Embrión turgente, 3. Dehiscencia de la testa, 4. Protocormo clorótico fusiforme, 5. Pseudobulbo clorótico fusiforme, 6. Pseudobulbo callogénico, 7. Tejido caloso embriogénico, 8 pseudobulbo clorofílico, 9 pseudobulbo con cubiertas foliares, 10. Pseudobulbo clorofílico sin rizoides, 11. Generación de hojas, 12. Pseudobulbo con raíces, 13. Desarrollo foliar, 14. Apertura de la lámina foliar.

3. Diagrama 4. Desarrollo ontogénico de *Govenia capitata*



3.1 Desarrollo ontogénico de *Govenia capitata* durante el proceso de germinación *in vitro*.

Ruta morfogénica

Se estableció que el desarrollo ontogénico desde la siembra de la semilla hasta la formación de una planta completa mediante el cultivo y la germinación asimbiótica *in vitro* tarda 690 días, identificándose 12 estadios morfofisiológicos diferentes, los cuales se describen a continuación.

Estadio 1. Semilla

La semilla de forma alargada con los extremos redondeados, presentaba una testa con ornamentos en forma de rectángulos irregulares, de color beige y semitransparente, dentro de la cual se observaba un embrión de forma oblonga y de color café claro, que se encontraba en el centro, ocupando tres cuartas partes del ancho de la semilla y una quinta parte a lo largo de la misma (Figura 1).

Estadio 2. Embrión turgente

El embrión después de 30 días en cultivo presentó un aumento de tamaño y volumen, incluso con un cambio de coloración de café claro a blanco o ligeramente beige ocupando la mayor parte de la semilla pero aún permaneciendo dentro de la testa. Durante 90 días permanecieron en esta etapa. (Figura 2).

Estadio 3. Dehiscencia de la testa

El embrión conservó la forma oblonga pero aumentó su volumen haciendo que la testa presentara una ruptura en uno de los extremos y poco después el embrión se desprendió completamente de la testa. Esto ocurrió a los 150 días de la siembra de la semilla y duró aproximadamente 30 días, desde el inicio de la ruptura hasta la separación de la testa. (Figura 2).

Estadio 4. Protocormo clorótico fusiforme

Continuó el crecimiento del embrión modificando su morfología dando origen a un protocormo, el cual presentaba una forma fusiforme en algunos casos y en otros formas irregulares, con una epidermis lisa lustrosa de color blanco-amarillento, con numerosos rizoides simples hialinos en la parte media del protocormo. Estos cambios ocurrieron a los 150 días de desarrollo con una duración de 120 días. (Figura 3).

Estadio 5. Pseudobulbo clorofílico con rizoides

El pseudobulbo con rizoides adquirió en general una forma ovoide con la superficie lisa de color verde. Presentaba sobre la superficie media, rizoides rectos y simples que se encontraban en grupos de 1 a 15 rizoides, llegando a tener más de 50 cada pseudobulbo. Es importante señalar que no todos los pseudobulbos se volvieron clorofílicos, sino que una gran cantidad permaneció de color blanco. Este estadio ocurrió a los 270 días a partir de la siembra de las semillas y tuvo una duración de aproximadamente 30 días. (Figura 4).

Estadio 6. Pseudobulbo callogénico

Los pseudobulbos blancos detuvieron su proceso de desarrollo ya que se presentó una pérdida de diferenciación celular manifestada con la formación de tejido calloso, el cual se presentó en forma de masas celulares blancas, hialinas y amorfas. Las masas celulares proliferaron rápidamente provocando la formación de gran cantidad de callo. Esta respuesta se presentó en todos los pseudobulbos blancos y clorofílicos a los 270 días aproximadamente, con una duración de alrededor de 30 días. (Figura 5).

Estadio 7. Tejido calloso embriogénico

En este estadio se originó embriogénesis somática a partir del callo ya que se neoformaron embriones asexuales cloróticos con la forma típica de un pseudobulbo y con rizoides simples (no ramificados) alrededor de la parte media. Presentaban una epidermis lisa y se encontraban unidos a la masa celular que conformaba al callo. Esta etapa fue inmediata a la desdiferenciación celular (formación del callo) y se presentó alrededor de los 270 días con una duración de 30 días aproximadamente (Figura 6 y 6.1).

Estadio 8. Pseudobulbo clorofílico

Los pseudobulbos originados de tejido embriogénico generaron nuevamente rizoides simples pero ya en toda su superficie, al mismo tiempo, comenzaron a fotosintetizar tomando una coloración verde claro. A partir del día 300 se presentó esta etapa con una duración de 90 días aproximadamente. (Figura 7).

Estadio 9a. Pseudobulbo con cubiertas foliares

Los pseudobulbos clorofílicos de forma esférica generaron en su base una cubierta foliar del mismo tamaño que el pseudobulbo de forma triangular y de color púrpura, con rizoides alrededor del brote, el pseudobulbo aún se encontraba unido a restos de masa embriogénica de color blanquecino. Esta etapa se presentó a los 480 a los 690 días. (Figura 8 y 8.1).

Estadio 9b. Pseudobulbo clorofílico sin rizoides

El pseudobulbo clorofílico esférico exhibió una figura anillada con escamas triangulares en el margen del anillo. El pseudobulbo aun se encontraba unido a restos de masa embriogénica de coloración blanquecina y con rizoides en algunos casos. Esta etapa se presentó a los 390 días con una duración de 90 días aproximadamente. (Figura 9). En algunos casos se observaban pseudobulbos clorofílicos, ovoides y de forma alargada con internodos (1-6) donde se originaban yemas vegetativas blanquecinas de forma ovalada y también se encontraban yemas en el ápice del pseudobulbo que aún estaba unido a restos de masa embriogénica con rizoides. Esta etapa se originó a los 420 días con una duración de aproximadamente 60 días (Figura 9.1).

Estadio 9b'. Generación de hojas

Los pseudobulbos clorofílicos aún unidos a restos de masa embriogénica, originaron un primordio foliar en la región intermedia entre el pseudobulbo y el callo, o bien en la región apical, con una

coloración verde y púrpura. Esta etapa se presentó a los 480 a los 690 días. (Figura 10).

Estadio 10. Pseudobulbo con raíces

Mientras crecía la cubierta foliar, emergieron en la base del pseudobulbo de dos a tres raíces de color blanco sin ramificaciones justo por debajo del primordio foliar. Esta etapa se presentó de los 480 a los 690 días. (Figura 11).

Estadio 11. Desarrollo foliar

Se desarrolló una hoja verde a partir del primordio foliar desenvolviéndose la lámina. Esta etapa se presentó entre los 660 a los 690 días. (Figura 12).

Estadio 12. Apertura de la lámina foliar.

La planta presentaba una hoja de color verde, raíces blancas no ramificadas y un pseudobulbo completamente verde en posición horizontal. Esta etapa se presentó entre los 660 a los 690 días y se consideró que el proceso de germinación finalizó (Figura. 13)

Figuras

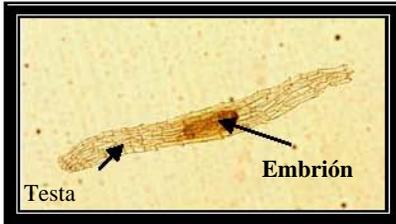


Fig. 1
Estadio 1. Semilla

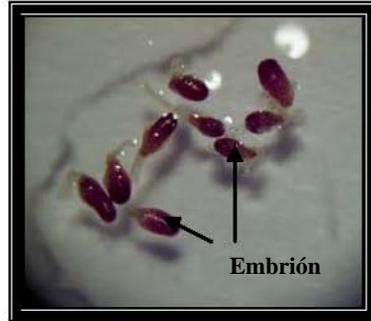


Fig. 2
Estadio 2. Embrión turgente
Estadio 3. Dehiscencia de la
testa.



Fig. 3
Estadio 4. Protocormo
clorótico fusiforme.

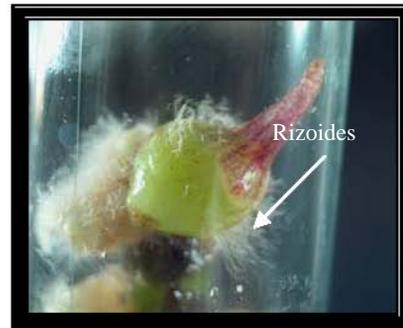


Fig. 4
Estadio 5. Pseudobulbo clorofílico
con rizoides.

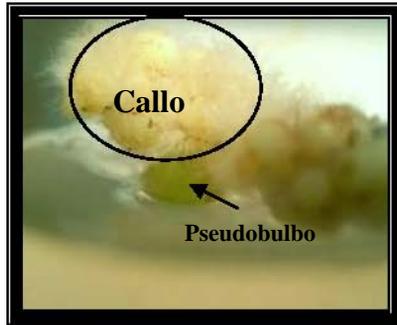


Fig. 5
Estadio 6. Pseudobulbo callogénico



Fig.6



Fig. 6.1

Estadio 7. Tejido calloso embriogénico



Fig. 7
Estadio 8. Pseudobulbo clorofílico



Fig. 8
Estadio 9a. Pseudobulbo con cubiertas foliares



Fig. 8.1

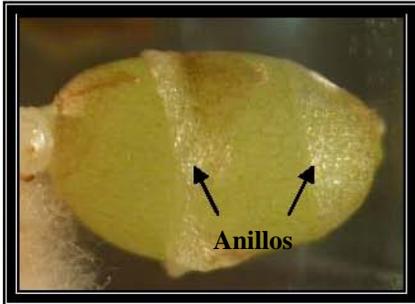


Fig. 9
Estadio 9b. Pseudobulbo
clorofílico sin rizoides.

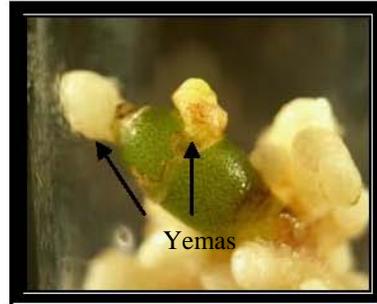


Fig. 9.1
Pseudobulbo con yemas



Fig. 10
Estadio 9b'. Generación de hojas

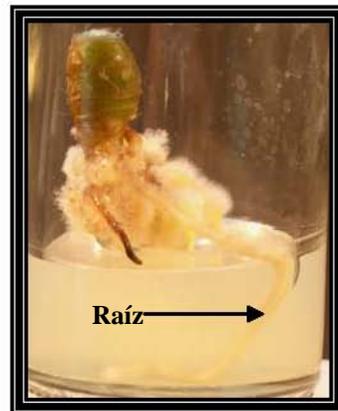


Fig. 11
Estadio 10. Pseudobulbo
con raíces



Fig. 12.
Estadio 11. Desarrollo de la hoja

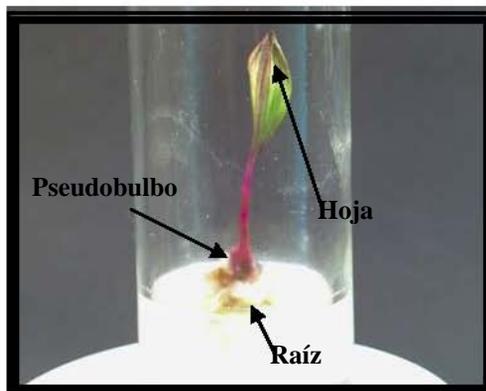


Figura 13.
Estadio 12. Apertura de la lámina foliar



VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1. Pruebas de viabilidad en semillas de *Govenia capitata*.

Como se puede apreciar en la gráfica 1, la viabilidad inicial es muy alta ya que tuvo el 98 %, presentándose en el lote un número poco importante de semillas vanas, sin embargo estas pierden totalmente la viabilidad en poco tiempo (77 días), Teniendo su caída más drástica entre los días 42 y 49, ya que la reducción de la viabilidad va del 69 % a 1.6 %. Esto indica que el periodo de vida útil en almacén es de seis semanas, el cual se considera muy corto ya que los estudios hechos en la orquídea terrestre *Bletia urbana* (Luna *et al*, 1999) reportan el mantenimiento de una viabilidad alta en semillas almacenadas por diez años. En especies del género *Cattleya* y en *Dendrobium nobile* las semillas han permanecido viables por más de 464 días almacenadas a -74 ° C (Pritchard, 1984).

Como se aprecia en los resultados obtenidos (Tabla 1) existen dos periodos en los cuales se mantiene un porcentaje de viabilidad estable que son entre la tercera y quinta semanas (69 %) y la séptima y novena semanas con 1.6 %. De estos, el primero es el que presenta la caída más drástica de la viabilidad en un periodo muy corto (15 días). Por lo anterior, es importante que para la realización de estudios posteriores de semillas de *Govenia capitata* y su germinación se considere efectuarlos durante las seis semanas posteriores a la colecta para que se tenga la seguridad de trabajar con semillas vivas.

Diversos autores reportan que la viabilidad de las semillas en las diferentes especies de orquídeas varía considerablemente entre cada una y que en muchas decrece rápidamente (Rasmussen, 1995., Stoutamire, 1996., Kitsaki, *et al.*, 2004).

St-Arnaud, y colaboradores (1992) hicieron estudios de viabilidad y germinación en *Cypripedium acaule* encontrando que obtuvieron la germinación *in vitro* del 3.4 % de las semillas a pesar de que la viabilidad del lote era del 72.0%, mencionando que esta diferencia fue debida quizás a un estado de latencia de las semillas, llegando a la conclusión de que el potencial de germinación probablemente es muy dependiente del estado fisiológico (determinado por la edad después de la polinización) de las semillas, por lo que pueden variar los resultados si las semillas provienen de cápsulas de diferente edad.

2. Comportamiento de los embriones cultivados en los cinco medios de cultivo experimentales (MS, K “C”, Dixon, SP1 y SP2).

Como se puede apreciar en la Tabla 4, el mantenimiento de la viabilidad de los embriones de *G. capitata* cultivados en los cinco medios experimentales fue muy diferente, siendo los mejores medios el SP2 y el SP1 ya que en éstos se mantuvo una viabilidad del 100 y del 90.9 % a los 120 días, caso contrario con el medio Dixon el cual no mantuvo la viabilidad de ningún embrión (0.0 %). Los medios de cultivo Murashige y Skoog y Knudson “C” tuvieron un comportamiento intermedio con 41.0 y 47.0 % respectivamente.

Desde el éxito logrado por Knudson en la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de orquídeas (Knudson, 1922), se han propuesto muchas formulaciones de medios de cultivo para la germinación de orquídeas (Arditti, 1972).

Han sido adicionados al medio de cultivo para la inducción de la germinación de orquídeas diversos complejos químicos naturales como son el homogenizado de plátano, de papa (Arditti y Ernst, 1984), de jitomate, harina de pescado, caseína hidrolizada, endospermo líquido de coco (Merino, 1987), de germinado de soya (Obaidul *et al.* 2000) y extracto de piña (Kitsaki *et al* en 2004), entre otros. En particular para orquídeas terrestres está reportado que el extracto de taro promueve el crecimiento *in vitro* (Yam, *et al* 1991 citado por Obaidul, *et al.* 2000). Por otra parte, Arditti y colaboradores (1982) reportan el efecto inhibitorio de la germinación del homogenizado de plátano adicionado al medio nutritivo. George y Sherrington (1984), señalan que el endospermo líquido de coco ha demostrado ser inhibidor del crecimiento de embriones cultivados *in vitro*. No reporta cuales de sus componentes son las causantes de la inhibición, sugiriendo que el compuesto responsable puede ser un inductor natural de la dormancia como lo es el ácido abscísico.

Las diferentes especies de orquídeas tienen requerimientos particulares de nutrimentos para la germinación de sus semillas y subsecuentemente para el crecimiento de las plántulas. Por esta razón se hace necesario experimentar con diferentes composiciones de medio para seleccionar el adecuado, entendiendo que inicialmente la

respuesta de los embriones estará relacionada con los componentes que se le suministren en el medio para su germinación.

Si bien existieron diferencias en la composición química entre los cinco medios, es claro que los cuatro que carecieron de endospermo de coco si pudieron mantener la viabilidad de los embriones durante 120 días.

Se sabe que el endospermo líquido de coco utilizado en este estudio como componente del medio nutritivo Dixon, es un complejo natural que contiene 18 aminoácidos, tres compuestos nitrogenados, seis ácidos orgánicos, cuatro diferentes azúcares, tres azúcares alcohólicas, nueve diferentes vitaminas y hormonas de los grupos auxínico, citocinínico y giberélico (anexo II).

Autores como Fu Xiang y colaboradores (1997) estudiaron la germinación asimbiótica de *Cymbidium ensifolium* encontrando que el ELC favoreció la germinación y el desarrollo de los protocormos. Ishii, y colaboradores (1998), trabajando con *Phalaenopsis* cv. Santa Cruz indujeron tejido calloso embriogénico al adicionar 200 ml / L de endospermo líquido de coco al medio "Vacin y Went". Kitsaki, y colaboradores en el 2004 reportaron el efecto de la adición de ELC en el cultivo de semillas de especies del género *Ophrys*, señalando un efecto diferencial según el grado de madurez de las semillas, Los complejos naturales no siempre tienen un efecto inductor de la germinación en todas las especies ya que, como lo reportan Obaidul, y

colaboradores (2000). Las altas concentraciones de complejos orgánicos naturales tienen un efecto acumulativo deletéreo para la germinación.

Un inconveniente con la adición de complejos orgánicos es el desconocimiento de su composición química exacta aunado a la variabilidad debida al origen del fruto de donde se extraiga, por lo que, se pueden producir resultados variables dependiendo de la fuente. Por lo tanto, la respuesta *in vitro* dependerá de las variaciones en la composición del complejo en cada caso, aunado a los diferentes requerimientos nutricionales y hormonales entre las variedades de las orquídeas que se estén estudiando.

Consideramos que en este caso la riqueza de sustancias de los más de 37 componentes del endospermo adicionado al medio Dixon fue uno de los factores principales que influyeron en la pérdida de viabilidad y por lo tanto en la nula germinación de los embriones de *G. capitata*. Aunado a esto cabe resaltar que los medios con la mejor respuesta utilizados para la germinación de *Govenia capitata* fueron los de menor concentración de nutrimentos (SP1, SP2 y Knudson "C") y que la respuesta más baja correspondió a los embriones cultivados en el medio nutritivo más rico, el MS. Lo anterior indica que la composición química del medio nutritivo sí afectó el mantenimiento de la viabilidad y la supervivencia de los embriones de *Govenia capitata*, a este respecto, Stenberg y Kane, (1998) señalan que la composición

del medio nutritivo o la variación de la concentración de alguno de sus componentes determinó la respuesta de germinación de la orquídea *Encyclia boothyana* var. *Erythronioides*. Efecto ya anteriormente reportado por La Garde, (1929) y por Smith (1932) en híbridos de *Laeliocattleya* y en especies del género *Cattleya* reportados por Curtis y Spoerl (1948) y Raghavan y Torrey (1964).

Kitsaki, y colaboradores (2004), señalan que la formación de protocormos depende del genotipo, además señalan que el medio enriquecido con ELC es útil para la germinación *in vitro*, pero para el desarrollo de las plántulas se requiere la sustitución del ELC por otro componente.

3. Efecto de la adición de diferentes carbohidratos y de complejos naturales

La disponibilidad de carbohidratos en el medio de cultivo es fundamental para la germinación *in vitro* de las orquídeas, lo que ha inducido a experimentar con variantes y combinaciones de carbohidratos y/o extractos naturales.

Ernst, y colaboradores (1971) estudiaron el efecto de los azúcares D-glucosa, D-fructosa, D-galactosa, sacarosa, maltosa, celobiosa, trealosa melibiosa, lactosa, rafinosa, melezitosa y estaquiosa adicionados al medio de cultivo Knudson "C", en el desarrollo de plántulas de *Phalaenopsis* cv. *Doris*, obteniendo una supervivencia del 100% con maltosa, 85% con lactosa, 0.0% con D-galactosa y un 100% en el resto de los azúcares. Por otra parte, reportaron que las plántulas germinadas en melibiosa y lactosa no

lograron diferenciarse. Ellos señalan que la maltosa es captada íntegra por el embrión sin ninguna hidrólisis previa. Esto podría explicar, al menos en parte, la incapacidad de muchas plántulas de orquídea para crecer y desarrollarse en presencia de polisacáridos como el almidón y la celulosa, aunque existen reportes de la germinación de las especies de los géneros *Miltonia* y *Odontoglossum* en un medio de cultivo adicionado con almidón de papa al 1.0 %, almidón de maíz o ambos (Hayes, 1969).

Harrison, y Arditti, (1978) mencionan que los requerimientos de carbohidratos para la germinación de semillas de orquídeas son muy variables, y que muchas investigaciones han sido dirigidas a definir el factor o los factores nutritivos provistos por el hongo que propician el cambio de fase de protocormo a plántula. Es claro que la sacarosa es un requerimiento para el crecimiento de las plántulas y que estas pueden sintetizarla a partir de sus componentes simples como es la glucosa o fructosa las cuales pueden ser proporcionadas mediante la adición de complejos naturales al medio de cultivo.

Smith, (1973) reportó el papel de la sacarosa, glucosa, manosa, rafinosa, manitol y trealosa en la germinación de semillas de orquídeas.

George y Sherrigton, (1984) señalan que las especies vegetales *in vitro* varían en su capacidad de utilizar azúcares diferentes a la sacarosa. Señalando que aunque puede crecer callo de zanahoria en un medio con maltosa, en este mismo medio solo se obtiene un pequeño crecimiento de tejidos cultivados de *Aser*. Similarmente el

crecimiento de tejidos de soya en medios con maltosa por lo general es muy lento.

St-Arnaud y colaboradores (1992) reportaron el uso de extracto de papa y glucosa adicionados al medio de cultivo Murashige y Skoog, para la germinación de *Cyrtopodium acaule* en donde se inició la germinación hasta los 120 días y se obtuvo un porcentaje de germinación máximo del 72%.

Mc.Kinley y Camper en 1997 reportaron que para la germinación de *Goodyera repens var. ophioides* utilizaron el medio para cultivo microbiológico papa-dextrosa-agar adicionado al medio de nutritivo de Murashige y Skoog, obteniendo hasta un 33% de germinación.

Más recientemente Cho KeunHo y Ahn YoungHee (2000), estudiaron el efecto de la sacarosa adicionada al medio de cultivo Murashige y Skoog (50 %) en la inducción de la germinación y la obtención de plántulas de *Bletilla striata*, encontrando que la sacarosa (20 g/l) redujo la germinación, pero influyó incrementando la longitud de raíces y el peso fresco en las plantas.

Obaidul y colaboradores (2000), reportaron el uso de diversos extractos como el de papa, de taro, de homogenizado de plátano y de germen de soya combinados con sacarosa, donde en todos los casos indujeron a las 10 semanas la germinación de semillas de *Cattleya*, encontrando que las concentraciones altas de extractos naturales tuvieron efectos deletéreos en la germinación y a concentraciones mas bajas incrementaron la producción de brotes.

Hew y Young (2004) mencionan que el efecto de los diferentes azúcares adicionados al medio de cultivo para la germinación de orquídeas es específico para cada especie. Por ejemplo las especies de *Cymbidium* crecen mejor con sacarosa que con maltosa, glucosa o fructosa y que la glucosa inhibe la multiplicación de los protocormos. En contraste, los tejidos de *Vanda* proliferan mejor en un medio nutritivo sin azúcar pero adicionado con endospermo líquido de coco, posiblemente indicando que *Vanda* es más sensible a altas concentraciones de azúcar. Las especies de *Dendrobium* y *Aranda* tienen una fuerte afinidad con la fructosa más que con la glucosa y la sacarosa.

En el caso de *Govenia capitata* se mostró en este estudio que solamente el medio de cultivo Knudson "C" que fue adicionado con el extracto de papa fue donde se desarrollaron mejor y más rápido las plántulas.

La utilización de complejos orgánicos adicionados a los medios de cultivo para la germinación es una herramienta simple, económica y conveniente para mejorar los resultados de la multiplicación de plantas de orquídeas *in vitro* con fines de conservación o comerciales.

4. Germinación *in vitro*

4.1 Nutrición

En un estudio de la inducción de la germinación *in vitro* de 29 especies de orquídeas terrestres se obtuvo la germinación de sólo

cuatro. Los autores señalan que la baja respuesta probablemente se debió a la composición del medio de cultivo más que a las condiciones de incubación (Henrich, *et al.*, 1981)

Henrich, y colaboradores (1981) quienes estudiaron la germinación *in vitro* de 29 especies terrestres de orquídeas cultivadas en el medio nutritivo de Norstog, encontraron que en este medio cuatro especies pertenecientes a dos géneros (*Cypripedium spp.* Y *Platanthera spp.*) solo presentaron la germinación de un individuo y que en una especie no pasó del estadio de protocormo, en cambio, dos especies (*Orchis spp.* y *Epipactis spp.*) obtuvieron en el mismo medio el 100% de germinación y la formación de plantas completas.

Arditti (1984), y Rubluo con sus colaboradores (1989) señalan que las orquídeas terrestres germinan mejor en medios pobres o diluidos que en medios completos. A este respecto otros autores (Kohl, 1962; Bose and Mukherjee, 1974;) reportaron también el uso exitoso del medio nutritivo de composición pobre Knudson "C" para la germinación de orquídeas.

Las plántulas de orquídeas terrestres cultivadas *in vitro* tienen altas tasas de mortalidad principalmente en dos estadios, siendo el primero antes de que el protocormo emerja de la testa de la semilla, y el segundo antes de que emerja la primera raíz en el brote en crecimiento. La muerte temprana de los protocormos se presenta en miembros de todas las subfamilias de orquídeas y puede ser debida a un balance de nutrientes inapropiado, a condiciones de cultivo no

adecuadas, a la presencia de luz en semillas sensibles, a la carencia de estimulantes del crecimiento apropiados, temperaturas de incubación extremas o mezclas de gases inadecuadas (Withner y Krieger (1985).

El segundo período de alta mortandad esta asociado principalmente con el período de rápida elongación de los brotes y con el desarrollo de la primera raíz. Esto es característico de los géneros *Dactylorhiza*, *Platanthera*, *Ophrys*, *Gymnadenia* y *Satyrum*, cuyas especies tienen dificultades para superar este estadio *in vitro*. En la naturaleza, este período involucra la transición de una nutrición casi completamente micorrízica a un estadio parcialmente autotrófico. Withner, C. L. y Krieger, R. E. (1985) señalan que los requerimientos de nutrientes pueden cambiar rápidamente durante esta fase de crecimiento y el alto contenido de azúcares y minerales de los medios de cultivo iniciales pueden posteriormente convertirse en tóxicos para las plántulas en crecimiento. Transfiriendo las plántulas en desarrollo a un medio de composición pobre en sales minerales y azúcares como es el medio Knudson "C", se incrementa la sobrevivencia y retrasa la mortandad. Esto coincide con los resultados obtenidos en este estudio del cultivo de *Govenia capitata* en el medio Knudson "C".

4.2 Velocidad de germinación

En este análisis se consideró como criterio de germinación el momento cuando el embrión adquiriría una apariencia turgente (se hinchaba), rompía la testa y se independizaba de ella. Se puede decir que el proceso de germinación *in vitro* de *Govenia capitata* es de los más largos entre las orquídeas, ya que se reporta (Arditti, 1992), para la mayoría de las especies un lapso entre los una y 37 semanas

después del inicio del cultivo, las semillas de *Govenia capitata* iniciaron su germinación a las 30 semanas, terminando en la semana 31. Esto indica que el proceso de germinación en sí, dura aproximadamente 30 días y el período de incubación es de más de 200. En este lapso de 200 días el embrión se hinchó de forma notoria ya que en un inicio ocupaba este aproximadamente el 20 % del volúmen de la testa, llegando a ocupar posteriormente más del 50 % de ésta. Aunque el inicio de la germinación fue simultaneo en los medios experimentales Knudson "C", SP1 y SP2, en general la respuesta fue muy baja (menos del 10 % del total de las semillas).

Gayá en 1995 utilizando los medios de cultivo Knudson "C" y Murashige y Skoog estableció que las semillas de *Bletilla estriata* germinan a los siete días, y *Spiranthes spiralis* a los 30 días. Las especies *Limodorum abortivum*, *Ophrys bombyliflora* y *Serapias parviflora* germinaron hasta los seis meses (Gayá, 1995).

Rasmussen y Whigham en 1998, determinaron el tiempo de germinación *ex vitro* e *in vitro* de las orquídeas terrestres *Goodyera pubescens* y *Corallorhiza odontorhiza* (entre 24 y 30 semanas); *Epipactis helleborine* (32 semanas), *Dactylorhiza maculata* (14 semanas), *Microtis pasiflora* (12 semanas), *Spiranthes sinensis* var. *Amoena* (ocho semanas) y *Bletilla estriata* (seis semanas), esto se debió a los requerimientos de nutrimentos que tiene la orquídea y a la especificidad de la micorriza en cada especie.

Debido a la carencia de órganos, las semillas de orquídeas tienen aparte de la sola presencia de humedad, otros requerimientos

para lograr la germinación. En este estudio, la carencia de correlación entre la alta viabilidad inicial de las semillas con la germinación, y la formación de protocormos, coincide con lo reportado para *Epipactis helleborin*, *Cypripedium reginae* y *Ophrys* sp (Rasmussen, 1995, Vujanovic et al. 2000., Kitsaki *et al.*, 2004) lo que indica que deben de ser satisfechos requerimientos nutritivos específicos para obtener altas tasas de germinación, como se aprecia en los resultados de germinación en cada medio de *Govenia capitata*. A este respecto, Kitsaki y colaboradores (2004), reportan que las semillas de *Ophrys* tienen la desventaja de que aunque pueden permanecer viables por largos periodos, ellas entran en dormancia con la maduración, por lo cual señalan que es preferible usar semillas inmaduras para la propagación *in vitro* para evitar este estado.

5. Efecto de la intensidad de la luz durante la germinación y desarrollo de las plántulas

La germinación de muchas orquídeas es afectada por la luz ya que esta puede actuar como agente estimulante o inhibidor, dependiendo de su longitud de onda y de la susceptibilidad de la planta de estudio (Withner y Krieger, 1985).

Govenia capitata produjo inicialmente protocormos aclorofílicos (blancos), al respecto Withner y Krieger (1985) señalan que esta carencia de clorofila no significa automáticamente que la especie requiera de oscuridad para su desarrollo en este estadio.

Con relación a la germinación *in vitro* de *Govenia capitata* bajo condiciones de iluminación directa e indirecta, fue claro que la presencia de la luz no inhibe su germinación, así como sucede en *Goodyera repens* var. *Ophioides* (McKinley y Camper (1997). Al respecto Arditti, (1984) señala que la luz aparentemente no tiene efectos negativos en la germinación de las orquídeas epífitas, pero existen reportes de que en algunas especies de orquídeas terrestres puede actuar como inhibidor de la germinación, como sucede en *Cyprypedium* y *Orchis spp.* (Harvais, 1973), las cuales deben de ser cultivadas en oscuridad total para lograr su germinación. Así también, Stoutamire (1974), señala que la inhibición de la germinación de las orquídeas terrestres por la luz, es un mecanismo de protección. Arditti, y colaboradores (1981) y Henrich y colaboradores (1981), reportan que la iluminación tiene un efecto de reducción de la germinación de las semillas de *Calipso bulbosa* y *Epipactis gigantea*, y que debido a que la respuesta de germinación bajo condiciones de iluminación de diferentes géneros de orquídeas terrestres es muy variada, se dificulta hacer generalizaciones sobre su efecto (Arditti *et al*, 1981). A este respecto Rasmussen (1995) señala que las reacciones de las semillas a la luz parecen ser muy complicadas y estar sujetas a la variación específica, por lo que se requiere mas investigación tanto para entender mejor las adaptaciones naturales de la semillas, como para mejorar los procedimientos de germinación de especies de interés.

Si bien la luz no afectó en sí el proceso de germinación de las semillas de *Govenia capitata*, sí hubo un claro efecto negativo de ésta en la supervivencia *in vitro* de los protocormos, ya que fue evidente que en presencia de luz directa se indujo un necrosamiento y muerte

de éstos y del tejido calloso acompañante. A diferencia de los protocormos cultivados bajo luz indirecta los cuales, tuvieron un crecimiento sano y una sobrevivencia del 100%. Withner y Krieger (1985) señalan que la presencia de la luz es necesaria para el desarrollo normal de los protocormos clorofílicos de algunas especies terrestres, pero inhibe el crecimiento de protocormos en otras como en *Gymnadenia conopsea*, *Cypripedium irapeanum*. A su vez, Rasmussen (1995) señala que en especies terrestres el mantenimiento en cultivo con bajas intensidades de luz continua o con fotoperiodos afecta la germinación, ya que existen reportes que intensidades luminosas tan bajas como 100 Lux inhiben la germinación. Estos resultados no apoyan la hipótesis de que los requerimientos de luz u oscuridad para la germinación *in vitro* de *G. capitata* están correlacionados con el requerimiento de un hábitat soleado o sombreado como lo menciona Stoutamire (1963; 1964; 1974), quien estudiando 11 especies de orquídeas terrestres encontró que algunas de éstas que crecen exclusivamente a sol abierto, requieren de condiciones de oscuridad para germinar (Henrich *et al.* 1981).

6. Generación *in vitro* de protocormos somáticos (clorofílicos) de *Govenia capitata* a partir de tejido calloso.

Además de ser posible la germinación *in vitro* de *Govenia capitata* se descubrió que esta manifiesta naturalmente un gran potencial callogénico espontáneo y de generación de embriones somáticos en ausencia de hormonas (Tabla 5, Gráfica 2).

Los protocormos generados a partir de semillas, presentaban una morfología fusiforme y un color blanquecino (ver Fig. 3), al alcanzar 5 mm de longitud evidenciaron la presencia de una gran cantidad de protuberancias epidérmicas, hasta llegar a ser una masa amorfa de tejido. Las protuberancias crecieron y adquirieron una forma globular con la presencia de muchos rizoides formándose así embriones somáticos clorofílicos, los cuales posteriormente se separaron de la masa callogénica y comenzaron un crecimiento independiente hasta formar plantas completas. Las estructuras globulares formadas (embriones somáticos) no fueron morfológicamente uniformes sino que presentaban forma esférica u ovoide.

La embriogénesis somática como la que se obtuvo en este estudio es un proceso por el cual se produjeron embriones a partir de células somáticas. Este proceso lo presentan más de 60 familias de plantas, entre ellas la familia Orchidaceae.

Un modo reiterado de desarrollo de las orquídeas cultivadas *in vitro* es a través de una serie de eventos peculiares, dentro de los cuales se encuentra la embriogénesis adventicia, la cual mediante la división celular y diferenciación del tejido cultivado, se desarrollan un grupo de estructuras o cuerpos proliferativos morfológicamente idénticos a los protocormos, los cuales se desarrollan en pequeñas plántulas exactamente de la misma forma como se desarrollan los embriones sexuales provenientes de las semillas.

Esta producción de embriones somáticos es un ejemplo muy claro de las potencialidades cigóticas completas de las células diferenciadas y de la habilidad de tales células para expresar estas potencialidades dentro de la organización de la planta completa. Las condiciones que permiten que esta totipotencialidad sea expresada por células diferenciadas son difíciles de definir con precisión, y con seguridad son muy diversas. Aparentemente, ninguna sustancia en específico o grupo de sustancias es universalmente requerida. Las células tienen que ser inducidas a dividirse, a menudo por un factor promotor de la división, el cual tiene que ser provisto con los nutrientes adecuados para soportar sus propios mecanismos de síntesis. No es sorprendente que haya variaciones en la facilidad con la cual la división puede ser estimulada y en los materiales precursores apropiados para los procesos metabólicos necesarios de las células. Lo que se aprecia claramente, es que el patrón de desarrollo organizado que conduce a la producción de una planta completa no puede ser atribuible al medio externo. Por supuesto, tiene su origen en el complemento genético intacto de las células. El medio externo de la célula puede disparar la expresión e este patrón y habiéndolo disparado, puede mantener este desarrollo (Steeves y Sussex, 1991).

Existen dos tipos de embriogénesis somática *in vitro*: directa e indirecta. La forma indirecta implica la necesidad de una inducción para que las células somáticas sigan la vía embriogénica, tras pasar por una fase proliferativa (callogénica) y cambiar su competencia a la expresión de embriogénesis (López y Perán, 1997).

Este tipo de regeneración mediante la formación de protocormos a partir de tejido calloso ha sido descrito en la alianza *Odontoglossum* (Morel, 1971; 1974) en algunas orquídeas como *Aranda* (Goh, 1973), *Rhynchostylis* (Vajrabhaya y Vajrabhaya, 1970), en *Ophrys* (Champagnat y Morel, 1972; Morel, 1974) y en *Paphiopedilum* (Morel 1974; Stewart and Button 1975; 1976).

Se han hecho estudios anatómicos en donde se ha demostrado que el origen de los protocormos (embriones) adventicios es muy variable. En *Cymbidium* estos se originan a partir de la epidermis, a partir de células meristemáticas (Champagnat et al 1966; Rutkowski 1971), en yemas de *Cattleya*, a partir de la hipodermis de tejidos de inflorescencia joven (Champagnat and Morel, 1969).

La embriogénesis somática *in vitro* fue reportada por primera vez para orquídeas en 1948 por Curtis y Nichol, en especies del género *Vanda*. Mas tarde Stewart y Button (1976) reportaron la generación de tejido calloso embrionario a partir de semillas durante la germinación de *Paphiopedilum spicerianum* y de híbridos de *Epidendrum* (López y Perán, 1997).

Por su respuesta *Govenia capitata* presentó una embriogénesis somática de tipo indirecto. Esta respuesta fue masiva (cientos de embriones) y espontánea, por lo que manifestó una enorme capacidad de multiplicación aplicable para la generación masiva de plantas utilizables en la recuperación ecológica, conservación de

germoplasma de esta especie y para su propagación comercial.

Es común que durante el proceso de embriogénesis somática se presenten anormalidades morfológicas, fisiológicas y genéticas, falta de maduración y dormancia de los embriones, entre otros (López, y Perán (1997). Thorpe en 1995 a este respecto señala que los embriones somáticos subcultivados para su maduración y posterior desarrollo, generalmente presentan una pobre germinación o un aberrante crecimiento. En este estudio no se requirieron tratamientos posteriores de postmaduración de los embriones y las plántulas no presentaron ningún tipo de anomalía.

Ya desde 1967, Taylor señaló la gran potencialidad de reproducción vegetativa mediante la embriogénesis adventicia de la orquídea *Malaxis paludosa*, en la cual se forman embriones similares a los producidos en el ovario y que posteriormente dan origen a nuevas plantas.

Con respecto a *G. capitata*, en este estudio de un total de 70 frascos de cultivo se generaron 1080 embriones somáticos a los 450 días de iniciado el cultivo, tiempo en que se terminó la evaluación, aun cuando se siguieron produciendo grandes cantidades de embriones (Grafica 2). Si bien la embriogénesis somática inició alrededor de los 300 días de cultivo, hubo un disparo en la respuesta entre los días 330 y 360 en donde casi se cuadruplicó el número de embriones (de 36 a 125), manteniéndose esta tasa entre los días 360 y 390 (de 125 a 518), reduciéndose posteriormente este incremento. Este comportamiento

quizá fue debido a la fase de inicio, madurez y senectud del tejido callogénico (George y Sherrigton, 1984). Es importante señalar que los embriones somáticos de *G. capitata* no presentaron un potencial ni callogénico ni embriogénico, sino que éstos siguieron la ruta de formación de plantas completas, por lo que el potencial embriogénico aparentemente sólo estuvo presente en los embriones sexuales, y los embriones somáticos no presentan una capacidad embriogénica secundaria, resultados que contrastan con lo reportado por Yi- Chang y Janick (1986), quienes señalan la inducción de embriogénesis somática a partir de callo derivado de embriones somáticos inmaduros en *Simmondsia chinensis*. Thorpe (1995), menciona que hay evidencia de que los embriones somáticos son metabólicamente diferentes a los embriones sexuales y que son incapaces de convertir eficientemente a los carbohidratos presentes en el medio, en reservas lipídicas y proteicas.

En la familia Orchidaceae se han hecho estudios de cultivo *in vitro* para la micropropagación, a partir de partes florales (Arditii y Ernst, 1993), brotes apicales (Khaw et al., 1978), ápices de raíz (Kerbauy, 1984), yemas apicales yemas florales (Lim-Ho y Lee, 1987) y meristemas apicales (Sagawa y Kunisaki, 1982), obteniéndose muy pocas plantas a partir de estos tipos de inóculos. También se ha estudiado la micropropagación mediante la embriogénesis somática proveniente de la proliferación de tejido calloso.

Kato en 1989 reportó la inducción de embriogénesis somática a partir de embriones sexuales de *Camelia spp.* Ishii y colaboradores

(1998) reportan la inducción de callo y generación de embriones somáticos en *Phalaenopsis*. Chen y Chang, (2000) posteriormente reportan la embriogénesis somática indirecta a partir de cultivo de callo de *Oncidium* en la oscuridad, en donde el callo originado fue de color amarillo claro, de consistencia compacta, organizado y de superficie lisa, el cual fue embriogénico y mantuvo su potencial por más de un año en subcultivo. Al igual de lo que sucedió en *Govenia capitata* en donde la formación de embriones fue espontánea cuando se expuso el callo a la luz, pero con la diferencia de que el callo de *Govenia* nunca fue clorofílico como sucedió en *Oncidium*. (Orchidaceae), Chen y Chang (2000) reportan la embriogénesis somática indirecta y regeneración de plántulas a partir de inóculos de raíz en el género *Oncidium* mediante la aplicación de hormonas (auxinas).

7. Desarrollo de la plántula.

El tiempo que requieren las plantas de orquídeas terrestres para desarrollarse desde protocormo hasta el estado maduro varía ampliamente. Curtis (1943) observó que especies de *Cypripedium* alcanzan el estado reproductivo a los ocho o más años después de la germinación. Otras especies terrestres tienen los periodos de maduración más cortos reportados para las orquídeas como *Zeuxine strautematica* y *Habenaria repens* las cuales se desarrollan muy rápido. Becker (1964) reportó que plantas de la especie *Eulophidium maculatum* produjeron semillas seis meses después de la germinación y que *Zeuxine strautematica* floreció en el primer año de crecimiento.

Observaciones hechas en este estudio de *Govenia capitata* indican que después de 27 meses de la germinación las plantas aún permanecen en estado vegetativo y juvenil.

8. Desarrollo ontogénico

Las semillas de todas las especies de orquídeas cuentan con un embrión simple que carece de endospermo (Arditti, 1984). Una vez que comienza la germinación, se desarrolla el protocormo que se considera un estadio entre el embrión indiferenciado y la plántula (Burgeff, 1959.; Warcup, 1975.; Arditti *et al.* 1990). El paso desde semilla hasta la formación de una planta de orquídea completa es a través de múltiples estadios los cuales, tanto su número como morfología son característicos de cada especie, siendo en algunas el proceso de germinación y desarrollo postgerminativo de sólo cinco estadios (*Laelia anceps*) y en otras muchos más.

Este estudio del desarrollo ontogénico de *Govenia capitata* duró 690 días y comprendió desde el estadio de semilla hasta la conformación de una planta completa, abarcando 14 estadios diferentes de desarrollo (Tabla 6 y Diagrama 4). Las semillas cultivadas *in vitro* no presentaron ningún cambio visible hasta los 60 días en los cuales el embrión presentó un incremento de tamaño y volumen y un cambio de color café claro a blanco o ligeramente beige (estadio 2). El incremento de tamaño del embrión fue notorio ya que abarcó la mayor parte de la semilla la cual, no presentaba ninguna

zona de dehiscencia. Este estadio duró 90 días, al término de los cuales se presentó el cambio de fase al estadio 3 (dehiscencia de la testa) en el cual el volumen del embrión fue tal, que rompió la testa y se separó de ella. Este estadio duró menos de 30 días ya que al observarlo por primera vez (a los 150 días de cultivo), se encontraron al mismo tiempo embriones en estadio 4 (protocormo clorótico fusiforme). Esta etapa de desarrollo duró 90 días en la cual el embrión creció y dio origen a un protocormo con rizoides en la parte media. A los 270 días de cultivo muchos protocormos aclorofílicos adquirieron una tonalidad verde (clorofílica), durando en esta etapa (estadio 5) menos de 30 días ya que se encontraron al mismo tiempo, pseudobulbos callogénicos (estadio 6), tejido calloso embriogénico (estadio 7) y pseudobulbos clorofílicos (estadio 8). Lo anterior nos indica que la inducción espontánea de callo, la adquisición de la capacidad embriogénica y la generación de pseudobulbos a partir de este callo es un proceso muy rápido, simultáneo y de muy corta duración (menos de 30 días). El estadio 6 tiene una permanencia de 30 días, dando origen al estadio 7 el cual permanece durante 150 días (hasta el día 420 de iniciado el cultivo) sin cambio a una fase superior. Es importante señalar que después de los 420 días de cultivo este callo comenzó a morir. Los pseudobulbos clorofílicos (estadio 8) se mantuvieron en esta etapa alrededor de 30 días dando origen al mismo tiempo a dos rutas morfogénicas, una hacia pseudobulbos con cubiertas foliares (estadio 9a) y la otra hacia pseudobulbos clorofílicos sin rizoides (estadio 9b).

La ruta que transita por el estadio de pseudobulbo con cubiertas foliares (estadio 9a) dio origen directamente a un pseudobulbo con raíces verdaderas (estadio 10). La ruta morfogénica mediante el paso por los estadios 9b (pseudobulbo clorofílico sin rizoides) y 9b' (pseudobulbo con hojas), fue el estadio de mayor duración en el desarrollo ontogénico del proceso de germinación de *Govenia capitata* ya que su permanencia fue de 210 días. Los pseudobulbos con hojas (estadio 9b') posteriormente generan raíces verdaderas (estadio 10), continuando con un desarrollo foliar (estadio 11) durante 210 días, para dar origen finalmente a la formación de plantas completas (estadio 12) después de 690 días de cultivo y desarrollo *in vitro*.

Como se puede apreciar en el desarrollo del proceso de germinación y postgerminativo de *Govenia capitata* los cambios durante el desarrollo de un estadio determinado al siguiente no son simultáneos en todas las semillas aunque provengan del mismo fruto ya que en un mismo momento de tiempo encontramos dos o más estadios de desarrollo diferentes. Stemberg y Kane (1998) reportan la misma asincronía en el desarrollo en *Encyclia boothiana*.

Stemberg y Kane (1998) trabajando con semillas cultivadas *in vitro* de *Encyclia boothiana* var. *Erythronioides* en el medio de cultivo Knudson "C", reportaron que la germinación tuvo una duración de ocho semanas y a la semana 12 formaron protocormos clorofílicos, seguidos de la formación de una o dos hojas y la presencia de rizoides, aunque

algunas plántulas formaron raíces. Dividiendo este periodo en seis estadios.

Kitsaki y colaboradores en 2004, reportan que las semillas de *Ophrys* cultivadas *in vitro* formaron protocormos, seguido de la formación de mini tubérculos, finalizando con la formación de plántulas. Estos autores encontraron que la callogénesis y la formación de protocormos adventicios son eventos del desarrollo determinados por el genotipo.

La germinación asimbiótica *in vitro* de *Govenia capitata* lograda en este estudio, permitió el conocer su desarrollo ontogénico desde la imbibición del embrión, los estadios postgerminativos y hasta la formación de una planta completa. La propagación *in vitro* de esta especie permitió establecer la ruta morfogénica de las plántulas y su potencial embriogénico.



VIII. CONCLUSIONES

- El periodo de vida útil de las semillas en almacén es muy corto (no más de 35 días) y presenta una caída de viabilidad un periodo muy breve (semanas).
- El mantenimiento de la viabilidad *in vitro* de los embriones cultivados dependió de la composición química del medio de cultivo.
- La transferencia *in vitro* de las plántulas en desarrollo de *Govenia capitata* a un medio de composición pobre en sales minerales incrementa la supervivencia.
- La correlación entre los componentes del extracto de papa adicionado al medio con el embrión, resultó alta, ya que este complejo natural permite el desarrollo *in vitro* de plántulas de *Govenia capitata*.
- El proceso de germinación *in vitro* de *Govenia capitata* es de los más largos entre las especies de la familia Orchidaceae (690 días).

- La apariencia aclorofílica de los protocormos de *Govenia capitata* no significa que la especie requiera de oscuridad para su desarrollo, sino más bien, fue una respuesta a la germinación a su ambiente natural terrestre.
- La presencia o ausencia de la luz no inhibe ni favorece la germinación de *Govenia capitata*, lo que nos da indicios de que el proceso de germinación no está correlacionado con el requerimiento de un hábitat soleado o sombreado, sin embargo, sí es afectado negativamente el desarrollo posterior de las plántulas en presencia de luz intensa.
- *Govenia capitata* presenta de manera natural un gran potencial morfogénico, el cual se manifiesta por medio de la desdiferenciación celular espontánea de los protocormos y por la generación de embriones somáticos a partir de tejido calloso en ausencia de fitohormonas.
- Por su respuesta *Govenia capitata* presentó una embriogénesis somática de tipo indirecta, masiva y espontánea.
- Los embriones somáticos generados *in vitro* no presentan potencial callogénico ni embriogénico, sino que siguen la ruta hacia la formación de plantas completas. Por lo que el

potencial embriogénico de *Govenia capitata* sólo está presente en los embriones sexuales.

- Las plántulas de *Govenia capitata* permanecen en estado vegetativo y juvenil aún después de 27 meses de la germinación, lo que nos indica la presencia de un periodo de inmadurez prolongado.
- El desarrollo ontogénico de *Govenia capitata* desde semilla hasta planta autótrofa, comprendió 14 estadios diferentes de desarrollo.
- La micropropagación de *Govenia capitata* lograda en este estudio permitió establecer las rutas morfogénicas y la totipotencialidad de los embriones sexuales.



IX. BIBLIOGRAFÍA

- Arditti, J. (1972). El profesor Lewis Knudson y la germinación asimbiótica de semillas de orquídeas: Cincuentenario. *Orquídea*. Agosto. : 229-236.
- Arditti, J. (1977). *Orchid Biology. Reviews and perspectives I*. Cornell University Press. London.
- Arditti J., Michaud, D. and Oliva, P. (1981). Seed germination of North American orchids. I. Native California and related species of *Calipso*, *Epipactis*, *Goodyera*, *Piperia* and *Platanthera*. *Bot. Gaz.* 142:442-453
- Arditti, J. (1982). *Orchid Biology. Reviews and perspectives II*. Cornell University Press. London.
- Arditti, J. (1984). *Orchid Biology. Reviews and perspectives III*. Cornell University Press. London.
- Arditti, J., Ernst, R., Yam, T.W., and Glabe, C. 1990. The contributions of orchid mycorrhizal fungi to seed germination: a speculative review. *Lindleyana*: 249-255.
- Arditti, J. (1992). *Fundamentals of Orchid Biology*. John Willey & Sons, Inc., U.S.A
- Arditti, J. and Ernst, R. (1993) *Micropropagation of Orchids*. John Wiley & Son. New York.
- Barba, A. A., Luna, R. S. y Romero, A, J. (2002). *Orquídeología Básica*. Biotemas. U.I.B.V.FES. Zaragoza. UNAM. México.
- Becker, J. (1964). *Eulophidium maculatum*. *Am. Orchid Soc. Bull.* 33:1066.
- Bose, T.K. and Mukherjee, T.P. (1974). Effect of growth substances on seedling growth and differentiation from callus of *Vanda in vitro* culture. *Orchid Rev*: 82:148-149.

Susana Padrón Hernández

Brundrett, M., Sivasithamparam K., Ramsay M., Krauss S., Taylor R., Hicks A., Abdul Karim N., Debeljak N., Mursidawati S., Dixon B., Batty A, Bower C. and Brown A. (2001) *Orchid Conservation Techniques Manual*. First International Orchid Conservation Congress-Training Course. Perth. Australia.

Burgeff, H. (1959). Mycorrhiza of orchids. In *The Orchids a Scientific Survey*. Edited by Whithner, C.L. The Ronald Press Co., New York. pp. 361-395.

Caneva, S. (1978). *Orquídeas*. Editorial Albatros, Buenos Aires.

Curtis J. T. (1943) Germination and seedling development in five species of *Cypripedium* L. *Amer. J. Bot.* 30:199-205.

Curtis J. T. and Spoerl, E. (1948). Studies on the nitrogen nutrition of orchid embryos: II. Comparative utilization of nitrate and ammonium nitrogen. *Amer. Orchid. Soc. Bull.* 17:111-114.

Champagnat, M., Morel, G., Chabut, P. and Cognet, A. M. (1966). Recherches morphologiques et histologiques sur la multiplication végétative de quelques orchidées du genre *Cymbidium*. *Revue Gén. Bot.*, 73 : 706-746.

Champagnat, M., Morel, G. (1969). Multiplication végétative des *Cattleya* est partir de bourgeons cultivés *in vitro*. *Soc. Bot. Fr. Mém.*, 116:111-132.

Champagnat, M., Morel, G. M. (1972). La culture *in vitro* des tissus de tubercules d' *Ophrys*. *C.R. Hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris*, 274 :3379-80.

Chen, J.T. and Chang, W.Ch. (2000). Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae). *Plant Science*. 160(2160): 87-93.

Cho, KeunHo and Ahn, YoungHee. (2000). Effect of sucrose and supplementary substances on the germination ecology and the seedling growth of native *Bletilla striata*. *Korean Journal of Environment and Ecology*. 14 (3): 205-211.

Susana Padrón Hernández

Davis, D. D., Giovanelli, J. y Rees, T. A. P. (1969) *Bioquímica Vegetal*. Editorial Omega S.A. Barcelona.

Devlin, R. M. (1980). *Fisiología Vegetal*. Ediciones Omega. Barcelona.

Dressler, R. L. (1972) Notas sobre el género *Govenia* en México. *Orquídea*. Junio: 143-147.

Dressler, R.L. (1981). *The orchids. Natural History and Classification*. Harvard University Press. London England.

Ernst, R., Arditti, J., Healey, P.L. (1971). Carbohydrate physiology of orchid seedlings. II. Hydrolysis and effects of oligosaccharides. *American Journal of Botany*. 58(9): 827-935.

Fanfani, A. and Rossi, W. (1988) *Guide to Orchids*. Simon & Schuster's. Milan.

Fu Xiang, D., Qian, Xiu, H., Mao Bi, Z. and Li De, B. (1997). Effects of some factors on the growth and differentiation of *Cymbidium ensifolium* protocorm. *Journal of Zhejiang Agricultural University*. 23(5): 5478-550.

Fumiaki, K. and Koujirou, T. (1997). Analysis of medium components used for orchid tissue culture. *Lindleyana*. 12(3): 158-161.

Gayá, S. T. (1995). *In vitro* cultivation of orchids. *Horticultura, revista de hortalizas, flores y plantas ornamentales*. 108: 99-100.

George, F. and Sherrigton, P.D. (1984). *Plant propagation by tissue culture*. Vol.1. Exegetics Limited. U.S.A.

Goh, C. J. (1973). Meristem culture of *Aranda* Deborah. *Malayan Orchids Rev.* 12: 9-12.

Gordon, M. C. (1990). *The Orchids Growers Manual*. Kangaroo Press U.S.A.

Greenwood E. W. (1992). *Govenia capitata* Lindley, a central mexican endemic orchid. *Orquídea (Méx.)* 12 (2): 169-177.

Susana Padrón Hernández

-
- Hagsater, E. (1972). El cultivo de *Govenia*. Orquídea. Mayo: 123-125.
- Harrison C, R., Arditti J. (1978). Physiological changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). Bot. Gaz. 1939 (2): 180 -189
- Harvais, G. (1973). Growth requirements and development of *Cypripedium reginae* in axenic cultures. Can. J. Bot., 51:327-332
- Hayes, B. A. (1969). Observations on orchid seed mycorrhizae. Mycopathol. Mycol. Appl. 38:138-144.
- Henrich, J.E., Smart D. P. and Ascher P.D. (1981). Terrestrial Orchid seed germination *in vitro* on a defined medium. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106(2): 193-196l.
- Hew C.S and Yong W. H. (2004). The physiology of tropical orchids in relation to the industry. World Scientific. Singapore.
- Hicks, J. A. (2000). Asimbiotic technique of orchid seed germination. The Orchid Seed bank Project. USA.
- Ichihashi, S. (1979). Studies on the media for orchid seed germination. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. 48(3): 345-352.
- Intuwong, O. and Sagawa, Y. (1973). Clonal propagation of sarcanthine orchids by aseptic culture of inflorescences. Am. Orchid Soc. Bull. 42: 209- 215.
- Ishii, Y., Takamura, T., Goi, M. and Tanaka, M. (1998). Callus induction and somatic embryogenesis of *Platanthera*. Plant cell Reports. 17(6/7): 446-450.
- Kato, M. (1989). *Camellia sinensis* L: *In vitro* regeneration, p.82-98.In: Y.P.S. Bajaj. Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 7. Medicinal and aromatic plants II. Springer- Verlag, Berlin.

Susana Padrón Hernández

Keun, H. C. and Young, H. A. (2000). Effect of sucrose and supplementary substances on the germination ecology and the seedling growth of native *Bletilla striata*. Korean Journal of Environment and Ecology. 14, (3): 205-211.

Kerbaui, G.B. (1984) Plant regeneration of *Oncidium varicosum* (Orchidaceae) by means of root tip culture. Plant Cell Rep. 3 pp. 27-29.

Khaw, C.H., Ong, H.T. and Nair, H. (1978). Hormones in the nutrition of orchid tissues in mericlone. In Proceedings of Symposium Orchideology. Orchid Soc. Of Southeast Asia, Singapore.

Kinderen, G, V. D. (1995). A method for the study of field germinated seed of terrestrial orchids. Lindleyana. 10(2): 68-73.

Kitsaki, C. K., S. Zygouraki., M. Ziobora and S. Kintzios. (2004) *In vitro* germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (Orchidaceae). Plant Cell Report.23: 284-290.

Knudson, L. (1922). Nonsymbiotic germination of orchid seeds. Bot. Gaz. 73:1-25.

Kohl, H. C. Jr. (1962) Notes on the development of *Cymbidium* from seed to plantlet. Amer. Orchid Soc. Bull. 31: 117-120.

La Garde, R. V. (1929). Non-symbiotic germination of orchids. Ann. Missouri Bot. Gard. 16: 499-515.

Lim-Ho, C.L., and Lee, G.C. (1987). Clonal propagation of *Oncidium* from dormant buds on flower stalk. Malay. Orchid Rev. (Singapore) 22: 48-52.

López, E y Perán, Q. R. (1997) Embriogénesis somática. Encuentros en la biología. Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga. España.

www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS39/embriogenesis.html

Susana Padrón Hernández

Luna, R. B. S., Ortega, L. M. P. y Chávez, A. V. M. (1999). Germinación y desarrollo simbiótico y asimbiótico de *Bletia urbana* (Orchidaceae) *in vitro*. En: Memorias del VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Septiembre. Oaxaca. Méx.

Markovina, A-L. and Mc Gee, P. A. (2000). Comparison of symbiotic and asymbiotic seed germination and plantlet development in *Sarcochilus* (Vandae; Orchidaceae). *Lindleyana* 15(2): 68-72.

Merino, M. M. E. (1987). Medio de cultivo. En: Hurtado, M. D. V. y Merino, M. M. E. (ED) Cultivo de Tejidos Vegetales. Trillas. México.

McKendrick, S. (2000). Manual para la germinación *in vitro* de orquídeas. Ceiba Foundation for Tropical Conservation.

McKinley, T.C. and Camper N.D. (1997). Action spectra of *in vitro* asimbiotic germination of *Goodyera repens* var. *ophioides*. *Lindleyana*. 12(1): 30-33.

Morel, G.M. (1971). The principles of clonal propagation of orchids. In: Proc. Sixth World Orchid Conf., ed. M. J.G. Carrigan. 101-106. Sydney: Six World Orchid Conference.

Morel, G.M. (1974). Clonal multiplication of orchids. In: The Orchids: Scientific Studies, ed. C.L. Withner, pp. 169-222. New York: John Willey and Sons.

Murashige, T and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid Growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*. 15: 473-497

Obaidul, I., Matsui S., Ichihashi, S. (2000). Effects of complex organic additives on seed germination and carotenoid content in *Cattleya* seedlings. *Lindleyana*. 15(2): 81-88.

Pauw, M. A, and Remphrey, W.R. (1993). *In vitro* germination of three *Cypripedium* species in relation to time of seed collection, media and cold treatment. *Can.J.Bot.* 71: 879-885

Susana Padrón Hernández

-
- Peña, D. A. (2002). Bioquímica. Limusa, Noriega Editores, México.
- Pritchard, H. W. (1984). Liquid nitrogen preservation of terrestrial and epiphytic orchid seed. *Cryo-Lett.*, 5, 295-300.
- Raghavan, V. and J. G. Torrey. 1964. Inorganic nitrogen nutrition of the seedlings of the orchid *Cattleya*. *Amer. J. Bot.* 51: 264-274.
- Rasmussen, H. N. y Whigham, H.E. (1993). Seed ecology of dust seeds in situ: A new study technique and its application in terrestrial orchids. *American Journal of Botany.* 80(12): 1374-1378.
- Rasmussen, H. N. (1995) *Terrestrial Orchids from Seed to Micotrophic Plant*. Cambridge University Press.
- Rasmussen, H. N., Whigham. (1998) The underground phase: a special challenge in studies of terrestrial orchid populations. *Botanical Journal of the Linnean Society.* 126: 49-64.
- Richardson, K. A., Peterson, R. L. and Currah, R.S. 1992. Seed reserves and early symbiotic protocorm development of *Platanthera hiperborea* (Orchidaceae). *Can. J. Bot.* 70: 291-300.
- Richter, W. (1972). *Orchid care: A guide to cultivation and breeding*. Mc. Millan. New York.
- Rivas, M., Warner, J y Bermudes, M. (1998). Presencia de micorrizas en orquídeas de un jardín botánico neotropical. *Revista de Biología Tropical.* 46 (2).
- Rubluo, A., Chavez V., Martinez, A. (1989). *In vitro* seed germination and re-introduction of *Bletia urbana* (Orchidaceae) in its natural habitat. *Lindleyana*, 4(2): 68-73
- Rutkowski, E. (1971). How meristem multiply. *Am. Orchid Soc. Bull.*, 40: 616-622.
- Sagawa, Y. and Kunisaki, J.T. (1982). Clonal propagation of orchids by tissue culture, in: *Proc. 5th. Plant Tissue and Cell Culture*, 1982. 683-684.

Susana Padrón Hernández

Sin autor. Diccionario de los alimentos. Consejos para vivir mejor. (1984), 2ª edición. Editia Mexicana S.A.

Smith, F.E.V. 1932. Raising orchid seedling asymbiotically under tropical conditions. Gard. Chron. 91:9-11.

Smith, S. E. and Smith, F. A. (1973). Uptake of glucose, trehalose and mannitol by leaf slices of the orchid *Bletilla hyacinthine*. New Phytol. 72, 957-964.

Smith, S.E. (1973). Asimbiotic germination of orchid seeds on carbohydrates of fungal origin. New Phytol.72. 497-499.

St-Arnaud, M., Lauzer, D., Barabé, D. (1992). *In vitro* germination and growth of seedlings of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). Lindleyana. 7(1): 22-27.

Steeves, A. and Sussex, I. M. (1991). Patterns in Plant Development. 2ª ed. E.U.A

Stemberg, M. L. and Kane M. E. (1998). *In vitro* seed germination and greenhouse cultivation of *Encyclia boothiana* var. *erythronioides* an endangered Florida orchid. Lindleyana. 13(2): 101-112.

Stewart, J. (1989). Orchid propagation by tissue culture techniques-past, present and future. In: Pritchard, H. W. (ed) Modern methods in orchid conservation. The role of physiology, ecology and management. Cambridge University Press. Great Britain.

Stewart, J. and Button, J. (1975). Tissue culture studies in *Paphiopedilum*. Am. Orchid Soc. Bull.44: 591-599

Stewart, J. and Button, J. (1976). Tissue culture studies in *Paphiopedilum*. In: Proc. Eighth World Orchid Conf., ed. K. Senghas, pp. 372-378. Frankfurt am Main: German Orchid Society Inc.

Stoutamire, W.P. (1963). Terrestrial orchid seedlings. Austral. Plants 2:119-122.

Susana Padrón Hernández

Stoutamire, W.P. (1964). Seeds and seedlings of native orchids. *Mich. Bot.* 3:107-199.

Stoutamire, W.P. (1974). Terrestrial orchid seedlings. In: Withner, C. L. (ed). *The Orchids. Scientific Studies.* Wiley, New York. 101-128.

Stoutamire, W.P. (1996). Seeds and seedlings of *Platanthera leucothea* (Orchidaceae). In: Allen C. (ed) *North American native terrestrial orchids. Propagation and production.* North. Am. Native Terrestrial Orchid Conf Proc. Allen, Germantown, Md.55-61.

Taylor, R. L. (1967). The foliar embryos of *Malaxis paludosa*. *Can. J. Botany.* 45: 1553-6.)

Thorpe, T.A. (1995) *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.

Tellez, V. A. (2002). The Pedregal of San Angel and its Orchids. *Orchid Review.* 10. (1242).

Vajrabhaya, M and Vajrabhaya, T. (1970). Tissue culture of *Rhynchostylis gigantea*, a monopodial orchid. *Am. Orchid Soc. Bull.* 39:907-910.

Vujanovic, V., St-Arnaud, M., Barab, D. and Thibeault, G. (2000). Viability testing of orchid seed and promotion of coloration and germination. *Ann. Bot.*86: 79-86.

Warcup, J. H. (1975). Factors affecting symbiotic germination of orchid seed. In: *Endomycorrhiza.* Edited by F. Sanders, Mosse, B. and Tinker, P. B. Academic Press, London. 87-104.

Withner, C. L.; Krieger, R. E. (1985). *The Orchids. Scientific Studies.* Publishing Company. Florida.

Wright, N. P. (1958) "Orquídeas de México". Fournier, S.A. México.

Yi-Chang, W. and Janick, J. (1986). Somatic embryogenesis in Jojoba. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 111(2): 281-287.

Yoder, J.A., Zettler, L. W., and Stewart, S. L. (2000). Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seed and seedlings, and evidence for water uptake by means of micotrophy. Plant Science. 156; 145-150.

Direcciones electrónicas

www.1.- <http://www.orchidlady.com/enciclopedia/f-g.html> (revisado en 2005)

www.2. - <http://www.saludmed.com/Salud/Nutrición/CHO.html> (revisado en el 2004)

www.3. Discusión *Goodyera* y *Governia*.
www.geocities.com/brassia.geo/6142000.html (revisado en 2003)



X. Anexo I

Medio Murashige y Skoog

Se utilizaron sales basales (SIGMA M 5524) las cuales se disolvieron en 500 ml de agua destilada, mientras se disolvían, fueron agregándose las vitaminas y el carbohidrato, una vez disueltos se ajustó el pH a 5.7 utilizando un potenciómetro manual adicionando NaOH 0.1 N o con HCL 1.0 N según fue necesario, y aforando a un litro con agua destilada y posteriormente se agregó el agar. Todo en constante agitación y calentamiento. Una vez disuelto el agar fue vertiéndose el medio en frascos tipo "gerber" con tapa de plástico. Se taparon y esterilizaron en autoclave a una presión de 1.5 Kg/cm² a una temperatura de 115° C, durante 15 minutos.

Medio de cultivo Dixon

Se preparó el endospermo líquido de coco de la siguiente manera: Se extrajo el endospermo líquido de un coco maduro y se puso a hervir hasta coagular las proteínas (30 minutos aproximadamente), se filtró y se tomaron 50 ml para preparar un litro de medio, el resto fue congelado para su posterior uso. (George y Sherrington, 1984)

Para la preparación del medio de cultivo se elaboraron soluciones madre de todas las sales y vitaminas que contiene el medio, se tomaron las cantidades necesarias de cada una y vertieron en un recipiente con medio litro de agua destilada en constante agitación y calentamiento, una vez disueltos, se agregó el

endospermo líquido de coco previamente hervido (ver anexo II.), fue agregándose el carbohidrato hasta disolverse y una vez disuelto se ajustó el pH a 5.6 utilizando un potenciómetro manual adicionando NaOH 0.1 N y con HCL 1.0 N, se llevó a un litro con agua destilada y se agregó el agar. Una vez disuelto se vertió en frascos tipo “gerber” con tapa de plástico, se taparon y se esterilizaron en autoclave a una presión de 1.5 Kg/cm² a una temperatura de 115° C, durante 15 minutos.

Medio de cultivo Knudson “C”

Sales basales (SIGMA K4003 “Modified Orchid Médium”) fueron disueltas en 500 ml de agua destilada y se agregó el carbohidrato, se mantuvo en constante agitación y calentamiento. Después se ajustó el pH a 5.3 utilizando un potenciómetro manual adicionando NaOH 0.1 N y con HCL 1.0 N, se agregó agua destilada hasta llevar a un litro, después se agregó el agar y una vez disuelto se vertió en frascos tipo “gerber” con tapa de plástico, se taparon y esterilizaron en autoclave a una presión de 1.5 Kg/cm² a una temperatura de 115 °C durante 15 minutos.

Medio de cultivo Knudson “C” con extracto de papa.

Para el medio de cultivo con extracto de papa, se tomaron sales basales (SIGMA K4003 “Modified Orchid Médium”) que fueron disueltas en 1000 ml de extracto de papa y agregó el carbohidrato, se mantuvo en constante agitación y calentamiento. Se ajustó el pH a 5.3 utilizando un potenciómetro manual adicionando NaOH 0.1 N y con HCL 1.0 N, se agregó el agar y una vez disuelto se vertió en

frascos tipo “gerber” con tapa de plástico, se taparon y esterilizaron en autoclave a una presión de 1.5 Kg/cm^2 a una temperatura de $115 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos.

Medio de cultivo SP 1

Se tomaron el 50 % de las sales basales de Murashige y Skoog (SIGMA M 5524) recomendadas para un litro y se disolvieron en 500 ml de agua, una vez disueltas fueron adicionándole las vitaminas y la cantidad necesaria del carbohidrato, ya disueltos se ajustó el pH a 5.7 utilizando un potenciómetro manual adicionando $\text{NaOH } 0.1 \text{ N}$ y con $\text{HCL } 1.0 \text{ N}$, se llevó a un litro con agua destilada y posteriormente se agrego el agar, en constante agitación y calentamiento. Una vez disuelto el agar se procedió verter en frascos tipo “gerber” con tapa de plástico, fueron tapados y esterilizados en autoclave a una presión de 1.5 Kg/cm^2 a una temperatura de 115°C , durante 15 minutos.

Medio de cultivo SP 2

Se tomó el 25% de las sales basales de Murashige y Skoog (SIGMA M 5524) recomendada para un litro y se disolvieron en 500 ml de agua, una vez disueltas se adicionaron las vitaminas, y la cantidad necesaria del carbohidrato, ya disuelto se ajustó el pH a 5.7 utilizando un potenciómetro manual adicionando $\text{NaOH } 0.1 \text{ N}$ o con $\text{HCL } 1.0 \text{ N}$, según fue necesario, se llevó a un litro con agua destilada y posteriormente se agrego el agar, en constante agitación y calentamiento. Una vez disuelto el agar se procedió verter en frascos tipo “gerber” con tapa de plástico. Se taparon y esterilizaron en autoclave a una presión de 1.5 Kg/cm^2 a una temperatura de $115 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 15 minutos.

Composición de medios de cultivo Murashige y Skoog (MS), SP1, SP2, Knudson "C" (KC), Dixon.

<i>Macronutrientos</i>	<i>MS</i> mg/L	<i>SP1</i> mg/L	<i>SP2</i> mg/L	<i>KC</i> mg/L	<i>DIXON</i> mg/L
Cloruro de calcio CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	220	110	-	-
Cloruro de potasio KCl	-	-	-	-	250
EDTA sódico Na ₂ EDTA	37.3	18.65	9.325	-	37.3
Fosfato ácido de potasio KH ₂ PO ₄	170	85	42,5	250	-
Nitrato de amonio NH ₄ NO ₃	1650	825	412.5	-	-
Nitrato de calcio Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	-	-	-	1000	1000
Nitrato de potasio KNO ₃	1900	950	475	-	-
Sulfato de amonio (NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	500	250
Sulfato ferroso FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8	13.9	6.95	25	22.8
Sulfato de magnesio MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	185	92.5	250	250

Micronutrimientos

	MS mg/L	SP1 mg/L	SP2 mg/L	KC mg/L	DIXON mg/L
Ácido bórico H ₃ BO ₄	6.2	3.1	1.55	-	6.2
Cloruro de cobalto CoCl. 6H ₂ O	0.025	0.0125	0.00625	-	0.025
Molibdato de sodio Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.125	0.0625	-	0.25
Sulfato de cobre CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.025	0.0125	0.00625	-	0.025
Sulfato de manganeso MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3	11.15	5.575	7.5	22.3
Sulfato de zinc ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8.6	4.3	2.15	-	9.0
Yoduro de potasio KI	0.83	0.41	0.205	-	0.83
<i>Constituyentes orgánicos</i>					
Ácido ascórbico	-	-	-	-	10.0
Ácido cítrico	-	-	-	-	90.0
Biotina	-	-	-	-	0.01
Mio inositol	100	500	250	-	100
Niacina	0.5	0.25	0.125	-	0.5
Pantotenato de calcio	-	-	-	-	0.4
Piridoxina HCL	0.5	0.25	0.125	-	0.1
Tiamina HCl	0.1	0.05	0.025	-	0.4
Sacarosa	20000	20 000	20 000	20 000	20 000
<i>Complejos naturales</i>					
Endospermo líquido de coco	-	-	-	-	50 ml
<hr/>					
Otros					
Agua destilada (ml)	1000	1000	1000	1000	1000
Agar (Bioxon)	11000	11000	11000	11000	11000
pH	5.7	5.7	5.7	5.3	5.6

(Murashige y Skoog, 1962; Arditti, 1972; Arditti, 1977; Brundrett *et al*, 2001)

Anexo II.

Sustancias identificadas en la papa

Principios inmediatos

Agua, Proteínas, Hidratos de carbono, Grasas.

Sales minerales

Potasio, Sodio, Calcio, Magnesio, Hierro, Fósforo, Azufre, Cloro.

Vitaminas

Vitamina B1, Vitamina B2, Vitamina B6, Vitamina C, Vitamina E.

Nota: durante la cocción de las papas se destruyen en su totalidad las vitaminas, las sales minerales se disuelven al 50% y las albúminas se coagulan y se desintegran en un 50%.

(Sin autor. Diccionario de los alimentos, 1984)

Sustancias identificadas en el endospermo líquido de coco

Aminoácidos

Aspártico,	Glutámico,	Serina,	γ-amino butírico,
Asparagina,	Glicina,	β-alanina,	Treona,
Histidina,	Glutamina,	Arginina,	Lisina,
Valina,	Tirosina,	Prolina,	Homoserina,
Fenilalanina,	Hidroxiprolina.		

Compuestos nitrogenados

Amonio
Etanolamina
Dihidroxifenilalanina

Ácidos orgánicos

Málico, carboxílico de pirrolidona, Succínico, Cítrico, Shiquímico, Quínico.

Azucares

Sacarosa, Glucosa, Fructosa, Manitol

Alcoholes de azúcar

Sorbitol, m-inositol, sciloinisitol.

Vitaminas

Ácido nicotínico, Ácido pantoténico, Biotina, Riboflavina, Riboflavina, Ácido fólico, Tiamina, Piridoxina, Ácido ascórbico.

Sustancias de crecimiento

Auxina, Giberelina, 1, 3-difenil urea, Zeatina, Glucósido de zeatina, Zeatina ribósida, citocininas desconocidas.
(George y Sherrington, 1984)
