



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

EFFECTO DEL ESTÍMULO POR FRUCTOSA
DURANTE EL PROCESO DE GERMINACIÓN DE
SEMILLAS DE *Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A:

CLAUDIA XOCHITL CORTÉS SANCHEZ



DIRECTOR DE TESIS: M. en C. BÁRBARA SUSANA LUNA ROSALES

MEXICO, D.F. 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

La presente tesis fue realizada en la Unidad de Investigación en Biología Vegetal de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales.

A la M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales por su apoyo, consejos, tiempo y orientación para la realización de esta tesis.

A los miembros del Jurado:

M. en C Amadeo Barba Álvarez
M. en C. Ma. De Jesús Sánchez Colín
Biól. Juan Romero Arredondo

Por sus comentarios, ayuda, atención y tiempo dedicado para el enriquecimiento de este trabajo.

A la Biól. Balbina Vázquez Benítez, por todas las gentilezas que ha tenido para mí en todo este tiempo, por sus valiosos comentarios para esta tesis y principalmente por su amistad.

Al Biól. Rubén Zulbarán Rosales por al ayuda y apoyo, sin su insistencia no lo hubiera logrado.

A la Doctora Hortensia Rosas Acevedo por sus valiosos comentarios y sugerencias para mejorar esta tesis, también por el tiempo, dedicación, atención, insistencia, pero por sobre todo por su amistad y por creer en mí, por eso y mil cosas más...“GRACIAS TENCHA”.

A mis padres Ana y Luis, por todo lo que me han dado a lo largo de estos años, principalmente por mi herencia, si, la que he aprendido de ustedes como es: la educación, la lealtad, la honestidad, la fidelidad, el valor y la firmeza en mis convicciones. Los Amo, mil gracias.

A mis hermanos Octavio, César, Jaime y Jorge por lo que hemos compartido, por todo lo que me han dado y siguen dando, pero lo más importante por que sé que siempre contaré con ustedes, así, como ustedes conmigo. Los quiero el buti resto.

A mi hermana Rocío, por que eres la mejor hermana que tengo (bueno, eres la única terrenal), pero por sobre todo, por que siempre has estado conmigo, en todo y para todo. Te quiero el buti restísimo.

A mi hermana Adriana por todo lo que me diste, por todo lo que compartimos y por ser el ángel que siempre nos cuida. Hasta el cielo con todo mi amor.

A Raúl por ser quien eres, como eres y por lo más importante por ser el amor de mi vida. Te amo gordito de aquí a la galaxia más lejana 100000000 de vueltas y de regreso.

A mis hijos Mariana y Emiliano por ser lo más valioso que me han dado Dios y la vida y por quienes siempre daré lo mejor de mí. Los amo infinita e incondicionalmente.

A mis sobrinos Ari, Fer, Ximena, César, Jito, Musita y Dani. Los quiero mucho changuitos.

A toda mi familia que siempre me ha apoyado.

A mis suegros Amanda y Rubén, muchísimas gracias por su ayuda y apoyo.

A mis amigos incondicionales: Alma, Antonieta, Bebé, Beto, Gis, Marco, Mari, Rommel, Tencha, Toño, Vianey y Víctor. Los quiero un montón.

ÍNDICE

	PÁGINA
Índice	1
Cuadros	3
Figuras	5
Gráficas	5
Resumen	8
Introducción	10
Antecedentes	13
Semillas de orquídea	13
Germinación	13
Efecto del carbohidrato fructosa durante la germinación	18
Efecto de la fructosa en la germinación de <i>Laelia speciosa</i>	18
Descripción del género <i>Laelia</i>	19
Descripción de <i>Lelia speciosa</i>	20
Clasificación taxonómica	23
Objetivos e hipótesis	25
Material y métodos	26
Recolecta del material biológico	26
Prueba de viabilidad	26
Preparación del medio de cultivo MS	27
Carbohidrato experimental	29
Siembra e incubación de las semillas	30
Diseño experimental	31
Evaluación de germinación y desarrollo	36
Germinación	36
Índice de desarrollo	36
Plántulas con raíz verdadera	37
Diseño estadístico	38
Resultados	39
Viabilidad	39
Germinación	40

Efecto por la exposición inicial al medio MS+F.	42
Efecto del estímulo con fructosa en semillas de <i>Laelia speciosa</i> expuestas inicialmente 15 días sin F.	39
Efecto del estímulo con fructosa en semillas de <i>Laelia speciosa</i> expuestas inicialmente 30 días sin F.	43
Efecto del estímulo con fructosa en semillas de <i>Laelia speciosa</i> expuestas inicialmente 45 días sin F.	44
Efecto del estímulo con fructosa en semillas de <i>Laelia speciosa</i> expuestas inicialmente 60 días sin F.	45
Índice de desarrollo	46
Efecto del estímulo con fructosa en semillas de <i>Laelia speciosa</i> expuestas inicialmente 15 días sin F.	46
Efecto del estímulo con fructosa en semillas de <i>Laelia speciosa</i> expuestas inicialmente 30 días sin F.	47
Efecto del estímulo con fructosa en semillas de <i>Laelia speciosa</i> expuestas inicialmente 45 días sin F.	48
Efecto del estímulo con fructosa en semillas de <i>Laelia speciosa</i> expuestas inicialmente 60 días sin F.	49
Plántulas con raíz verdadera	50
Efecto del estímulo con fructosa en semillas de <i>Laelia speciosa</i> expuestas inicialmente 15 días sin F.	50
Efecto del estímulo con fructosa en semillas de <i>Laelia speciosa</i> expuestas	51

inicialmente 30 días sin F.	
Efecto del estímulo con fructosa en semillas de <i>Laelia speciosa</i> expuestas inicialmente 45 días sin F.	52
Efecto del estímulo con fructosa en semillas de <i>Laelia speciosa</i> expuestas inicialmente 60 días sin F.	53
Discusión	54
Viabilidad	54
Germinación	54
Índice de desarrollo	56
Plántulas con raíz verdadera	58
Conclusiones	61
Bibliografía	62
Anexo	68
Anexo 1	68
Anexo 2	69
Anexo 3	70
Anexo 4	71
Anexo 5	72
Anexo 6	73

ÍNDICE DE CUADROS

	PÁGINA
Cuadro 1. Estadios de desarrollo en la germinación de orquídeas.	14

Cuadro 2. Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog utilizado para la germinación de <i>Laelia speciosa</i> .	28
Cuadro 3. Tratamiento inicial para germinación y desarrollo de semillas de <i>Laelia speciosa</i> en el medio de cultivo sin fructosa (MS-F).	31
Cuadro 4. Tratamiento de exposición temporal de las semillas de <i>Laelia speciosa</i> en el medio de cultivo con fructosa (MS+F).	32
Cuadro 5. . Tratamientos de exposición permanente en el medio con fructosa.	33
Cuadro 6. Diagrama de flujo del diseño experimental	34
Cuadro 7. Estadios del embrión de <i>Laelia speciosa</i> .	37
Cuadro 8. Viabilidad de las semillas de <i>L. speciosa</i> (H.B.K.) Schltr. mediante la prueba de TTC.	39

 ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. <i>Laelia speciosa</i> (tomado de Halbinger & Soto, 1997).	24
--	----

ÍNDICE DE GRÁFICAS

	PÁGINA
Gráfica 1. Germinación de las semillas de <i>Laelia speciosa</i> en los diferentes tratamientos de exposición al medio MS-F y MS+F esterilizada por filtración.	40
Gráfica 2. Germinación de las semillas <i>Laelia speciosa</i> en los diferentes tratamientos de exposición al medio MS-F y MS+F esterilizada por autoclave.	41
Gráfica 3. Germinación de las semillas <i>Laelia speciosa</i> en los diferentes tratamientos de exposición al MS+F esterilizada por filtración y autoclave.	41
Gráfica 4. Germinación por el efecto del estímulo temporal de la fructosa en las semillas de <i>Laelia speciosa</i> expuestas inicialmente 15 días en MS-F.	42

Gráfica 5. Germinación por el efecto del estímulo temporal de la Fructosa en las semillas de <i>Laelia speciosa</i> expuestas inicialmente 30 días en MS-F.	43
Gráfica 6. Germinación por el efecto del estímulo temporal de la fructosa en las semillas de <i>Laelia speciosa</i> expuestas inicialmente 45 días en MS-F.	44
Gráfica 7. Germinación por el efecto del estímulo temporal de la fructosa en las semillas de <i>Laelia speciosa</i> expuestas inicialmente 60 días en MS-F.	45
Gráfica 8. Desarrollo por el efecto del estímulo temporal de la fructosa en las semillas de <i>Laelia speciosa</i> expuestas inicialmente 15 días en MS-F.	46
Gráfica 9. Desarrollo por el efecto del estímulo temporal de la fructosa en las semillas de <i>Laelia speciosa</i> expuestas inicialmente 30 días en MS-F.	47
Gráfica 10. Desarrollo por el efecto del estímulo temporal de la fructosa en las semillas de <i>Laelia speciosa</i> expuestas inicialmente 45 días en MS-F.	48
Gráfica 11. Desarrollo por el efecto del estímulo temporal de la fructosa en las semillas de <i>Laelia speciosa</i> expuestas inicialmente 60 días en MS-F.	49
Gráfica 12. Porcentajes de plántulas con raíz verdadera por el efecto del estímulo temporal de la fructosa de las semillas de <i>Laelia speciosa</i> expuestas inicialmente 15 días en MS-F, a los 154 días de iniciada la siembra.	50
Gráfica 13. Porcentajes de plántulas con raíz verdadera por el	51

efecto del estímulo temporal de la fructosa de las semillas de *Laelia speciosa* expuestas inicialmente 30 días en MS-F, a los 154 días de iniciada la siembra.

Gráfica 14. Porcentajes de plántulas con raíz verdadera por el efecto del estímulo temporal de la fructosa de las semillas de *Laelia speciosa* expuestas inicialmente 45 días en MS-F, a los 154 días de iniciada la siembra. 52

Gráfica 15. Porcentajes de plántulas con raíz verdadera por el efecto del estímulo temporal de la fructosa de las semillas de *Laelia speciosa* expuestas inicialmente 60 días en MS-F, a los 154 días de iniciada la siembra. 53

RESUMEN

En México se ha confirmado la presencia de 1,300 a 1,400 especies de orquídeas dentro de las cuales se encuentra *Laelia speciosa*, que es considerada una de las especies más bellas dentro de su género. Pero debido a esta belleza, su número en estado silvestre ha disminuido drásticamente al grado, que, actualmente, está sujeta a protección especial.

Las semillas de *Laelia speciosa* así como todas las semillas de las orquídeas, poseen un embrión indiferenciado, carente de suficientes reservas nutricionales, por lo que es necesario, en su hábitat natural, establecer una relación simbiótica con un hongo micorrízico que le proporcione los nutrimentos necesarios para la germinación.

La relación con la micorriza no es esencial bajo condiciones “*in vitro*” ya que los embriones pueden alcanzar su desarrollo morfogénico en un medio asimbiótico con una fuente adecuada de carbohidratos, entre los cuales se encuentra la fructosa.

Las semillas de *Laelia speciosa* utilizadas se colectaron de campo en la comunidad de Coenembo, Michoacán. Éstas se sembraron en un medio de cultivo sin fructosa en intervalos de tiempo de 15, 30, 45 y 60 días para determinar el efecto de la ausencia de fructosa en el desarrollo morfogénico del embrión al inicio de la siembra.

Para evaluar si existían diferencias entre el tipo de esterilización, se elaboró medio de cultivo el cual se esterilizó una parte en autoclave y otra por filtración, ambos adicionados con fructosa. Una vez transcurridos cada uno de los tiempos en los que las semillas estuvieron sin el estímulo de la fructosa, éstas fueron colocadas en repeticiones de cinco réplicas (tubos de ensayo) en cada uno de los medios con un tiempo de exposición a la fructosa de 7, 15, 21, 30, 38, 45, 52, y 60 días, para determinar el efecto limitado de ésta en el desarrollo del embrión. Cuando transcurrieron cada uno de los tiempos, las semillas fueron expuestas nuevamente a un medio de cultivo esterilizado en autoclave sin fructosa hasta completar 154 días desde iniciada la siembra, determinándose, por este proceso, el efecto de la estimulación limitada de la fructosa, con excepción de las semillas de cinco replicas por tratamiento y por tipo de esterilización, que permanecieron el resto del tiempo

hasta completar los 154 días en el medio de cultivo con fructosa, es decir, que no retornaron al medio de cultivo sin el estímulo del carbohidrato.

Para cada repetición se evaluó el porcentaje de germinación y el índice de desarrollo para determinar el efecto del estímulo de la fructosa en el desarrollo morfogénico del embrión.

A los resultados se les aplicó un análisis de varianza para establecer diferencias entre los tratamientos así como entre los tipos de esterilización.

Los porcentajes de germinación oscilaron entre el 60% y el 85% en los tiempos de 15, 30, 45 y 60 días sin exposición a la fructosa encontrándose diferencias significativas entre ambos tipos de esterilización del medio de cultivo, entre los diferentes tiempos sin exposición a la fructosa así como entre los días de exposición a la fructosa

El índice de desarrollo alcanzado por los embriones en las diferentes formas de esterilización del medio de cultivo, así como para los diferentes tiempos sin exposición a la fructosa, indica que los embriones alcanzaron sólo el estadio dos o de semilla hinchada. Si hubo diferencias significativas entre los diferentes tipos de esterilización del medio de cultivo, entre los diferentes tiempos sin el estímulo de la fructosa así como entre los días de exposición a la fructosa.

De todos los tratamientos estudiados entre el 0.5 y el 15% de las semillas alcanzaron el estadio de plántulas completas con dos hojas y raíz.

A los 154 días de iniciada la siembra, del total de las semillas, sólo el 15% alcanzó el estadio de plántula completa, este porcentaje no fue suficiente para establecer un tiempo mínimo requerido en el cual los embriones de las semillas de *Laelia speciosa* llevan a cabo su desarrollo morfogénico y desarrollan plantas completas, previamente se estableció, que sólo cuando el 50% de las semillas ha alcanzado el estadio de plántula completa, se puede determinar el tiempo mínimo requerido.

INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae es una de las tres familias más numerosas de plantas, estimaciones recientes del tamaño de esta familia sugieren que deben existir entre 20 000 y 30 000 especies agrupadas en 900 géneros, y se pueden encontrar en cualquier parte del mundo excepto en los polos y en los desiertos. De esas especies aproximadamente el 25% son terrestres, el 70% son epifitas y el otro 5% puede crecer en una gran variedad de soportes y diversos sustratos incluyendo rocas (Wiard, 1987; Arditti, 1992, Hágsater *et al.*, 2005). Esta enorme diversidad es el resultado de la larga evolución de este linaje desde que la primera orquídea apareció en la Tierra hace unos 100 o 110 millones de años (Hágsater *et al.*, 2005).

La flora orquídeológica de México comprende algo más de 1 200 especies de orquídeas y se estima que el número final de especies estará entre 1 300 y 1 400 (Hágsater *et al.*, 2005). Éstas se distribuyen aproximadamente en 159 géneros. Una de sus características más sobresalientes es la alta proporción de especies endémicas, ya que se han registrado 444 taxones endémicos que corresponden aproximadamente al 40% (Soto-Arenas, 1996; Ávila y Oyama, 2002). Esto coloca la familia de las orquídeas en tercer lugar en cuanto a riqueza de especies entre las familias de plantas mexicanas. Sólo las compuestas y las leguminosas son más numerosas (Hágsater *et al.*, 2005).

La gran mayoría de especies de orquídeas poseen semillas con un embrión inmaduro (indiferenciado) son los lípidos y las proteínas las principales reservas nutricionales (Leroux *et al.*, 1995; Stancato *et al.*, 1998; Hágsater *et al.*, 2005). Debido a que estas reservas son limitadas, en su hábitat natural para su nutrición, cuentan con una fase heterotrófica en la cual el desarrollo de las plantas es consecuencia de una relación balanceada con un hongo endofítico. Wahrlich (1886) estudió varias orquídeas y describió la digestión de los hongos asociados a ellas. Estas investigaciones sirvieron de sustento para establecer que en todas las orquídeas se presentan las micorrizas (Arditti, 1966; Clements, 1988; Smreciu y Currah, 1989; Peterson y Currah, 1990; Arditti, 1992; Goh, 1992;

Richardson *et al.*, 1992; Shoushtari *et al.*, 1994; Stancato *et al.*, 1998; Hágsater *et al.*, 2005).

El hongo proporciona a las semillas de orquídea los carbohidratos necesarios para continuar su desarrollo hasta que sea capaz de realizar la fotosíntesis (Arditti *et al.*, 1972, Ernst y Rodríguez, 1984, Smreciu y Currah; 1989; Arditti *et al.*, 1990, Leroux *et al.*, 1995, Stacanto *et al.*, 1998, Harrison, 1999; Hágsater *et al.*, 2005).

Es un hecho que se requiere un suplemento exógeno de carbono para la germinación de semillas y crecimiento de las plántulas (Peterson y Currah, 1990; Tsutsui y Tomita, 1990); sin embargo, la micorriza no es esencial para el crecimiento de los embriones de orquídeas en cultivo *in vitro*; en efecto, casi todas las especies pueden crecer en un medio asimbiótico que tenga una fuente conveniente de glúcidos simples, y solubles (Ernst, 1967; Ernst *et al.*, 1971; St-Arnaud *et al.*, 1992; Leroux *et al.*, 1995).

La fructosa debido a que es un monosacárido, es considerada una fuente de energía apropiada para las semillas de orquídea, ya que es capaz de inducir el desarrollo morfológico de los embriones, así como de promover la proliferación de brotes y raíces en algunas especies y en particular para *Laelia speciosa* (Luna y Barba, 1993; Velásquez, 1997; Buentello *et al.*, 1997; Neyra *et al.*, 1998).

En las orquídeas, el proceso de germinación se inicia con la degradación de los materiales de reserva de naturaleza lipídica del embrión y la aparición del almidón en las células basales del protocormo. La primera estructura en emerger es una hoja fotosintética, posteriormente emerge la segunda hoja y por último emergen las raíces (Leroux *et al.*, 1995).

De manera general, las plántulas de orquídeas deben llegar a un estadio donde no dependan de una fuente externa de glúcidos. Harrison y Arditti (1978) observaron que la dependencia de una fuente externa de glúcidos se anula, con la aparición de la primera hoja o del potencial de generar una. Harrison, (1977); y Arditti y Ernst (1984) demostraron que en un cierto estadio en el desarrollo de las semillas de orquídea, éstas no requieren mucho tiempo una fuente exógena de carbohidrato. Esto se comprobó cuando se colocaron semillas de *Cattleya aurantiaca* para su germinación en el medio de cultivo Knudson C (KC) suplementado con y sin el carbohidrato y posteriormente alternando ambos tipos de medio, y fue posible establecer que tan largo es el periodo durante el cual las semillas de

Cattleya aurantiaca requieren un suplemento exógeno de carbohidrato. Concluyendo que esta especie requiere de aproximadamente 40 días de estímulo de una fuente exógena de carbohidrato para poder continuar su desarrollo de manera autótrofa.

Debido al potencial ornamental de *Laelia speciosa*, se ha generado una explotación a fin de comercialarla. Así mismo, la acelerada destrucción de su hábitat y su importancia hortícola la han colocado dentro de la categoría de especie sujeta a protección especial y en un futuro cercano podría pasar a categoría de extinta si estos factores continúan operando (Soto y Hágsater, 1990; NOM-059-ECOL-2002; Eccardi y Becerra, 2003).

De acuerdo a la información con respecto a los requerimientos temporales de un carbohidrato para la germinación de las semillas de orquídea por un método *in vitro* y en particular para *Laelia speciosa*, es claro que es poco lo que se conoce, por lo que es necesario la investigación para generar conocimientos acerca de los requerimientos de carbohidratos y del desarrollo morfogénico *in vitro* de *Laelia speciosa*. Por ello en el presente estudio se generó información acerca del momento durante la germinación asimbiótica *in vitro*, en el cual es necesaria la aplicación del estímulo de la fructosa para inducir el desarrollo del embrión y de esta forma conocer más de la biología de la germinación de las semillas de *Laelia speciosa*.

ANTECEDENTES

SEMILLAS DE ORQUÍDEA

Las semillas de orquídea son muy pequeñas, miden entre 0.3 y 4 mm de largo y pesan por lo general entre 0.4 y 2 μg (Arditti, 1992; Hágsater *et al.*, 2005).

Las semillas de orquídeas poseen un embrión que generalmente no presenta albúmina, cotiledón, radícula, ni meristemas en el sentido estricto; el cuerpo del embrión, se encuentra en estado de proembrión constituido aproximadamente por cuatro tipos de células, las del suspensor, epidermis, cortex y meristemo (Harrison, 1977; Clemens, 1988; Peterson y Currah, 1990; Richardson *et al.*, 1992; Leroux, *et al.*, 1995; Hágsater *et al.*, 2005).

En el proembrión se reconoce un eje antero-posterior; las células del polo anterior son aproximadamente cuatro veces menos voluminosas que las células del polo posterior. El polo anterior, situado cerca de la calaza, es también llamado polo calazal, plumulario o apical, y el polo posterior que se encuentra situado cerca del micrópilo, es llamado polo micropilar, radicular o basal (Leroux *et al.*, 1995). Las células del proembrión contienen reservas proteínicas y lipídicas (Harrison y Arditti 1978; Ernst y Rodríguez, 1984; Peterson y Currah, 1990; Arditti, 1992; Leroux *et al.*, 1995).

GERMINACIÓN

Durante la germinación de las semillas de orquídea el embrión se hincha, eventualmente rompe la testa y sale de ésta. El embrión se ensancha tomando forma de ápice o cono, para terminar en protocormo. Durante esta etapa la clorofila se forma en la región meristemática y los pelos absorbentes comienzan a crecer en la epidermis. Posteriormente, la primera hoja y poco tiempo después la segunda, son formadas en el ápice del protocormo, seguido por la aparición de raíces. El tiempo requerido para cada uno de estos estadios varía dependiendo de la especie de orquídea (Arditti, 1966; Harrison y Arditti, 1978; Knudson, 1922 citado en Baker *et al.*, 1987).

De acuerdo con Arditti (1966) y Harrison y Arditti (1978), se le puede asignar un valor numérico a cada etapa o estadio de desarrollo en la germinación de las semillas de orquídea, quedando de la siguiente manera:

Cuadro1. Estadios de desarrollo en la germinación de orquídeas (Arditti, 1966; Harrison y Arditti, 1978).

Estadio	Estructura
1	Semilla
2	Semilla hinchada
3	Protocormo
4	Plántula con una hoja
5	Plántula con dos hojas
6	Planta con raíz verdadera

En las semillas de orquídea, los tres primeros estadios de germinación se suceden secuencialmente sólo por la presencia de agua y por sus propias reservas, pero la progresión en los estadios superiores depende de la presencia de un hongo simbiote. Sin una fuente externa de glúcidos el protocormo es incapaz de producir los azúcares necesarios para la organogénesis; el protocormo sobrevive gracias a la lenta utilización de sus reservas lipídicas y proteínicas (Arditti, 1966; Harrison, 1977; Harrison y Arditti, 1978, Arditti *et al.*, 1990, Leroux *et al.*, 1995, Stacanto *et al.*, 1998), pues hay evidencias que indican que las semillas no poseen glioxisomas, los organelos necesarios para el metabolismo de los lípidos en la obtención de carbohidratos (Harrison, 1977; Leroux *et al.*, 1995; Stacanto *et al.*, 1998). Esto explica la necesidad de las semillas de orquídea de una fuente externa de carbohidratos; por tal motivo, en su hábitat natural establecen una relación simbiótica con un hongo micorrízico (Arditti, 1966, 1979; Harrison, 1977; Harrison y Arditti, 1978; Arditti *et al.*, 1990, Leroux *et al.*, 1995, Stacanto *et al.*, 1998).

La relación embrión-hongo se da al principio de la germinación, y ayuda al desarrollo de la orquídea proporcionando azúcares, minerales y otros factores de crecimiento, los cuales el hongo produce a partir de polisacáridos como la celulosa, el

almidón y otras fuentes complejas como es la lignina y gomas que se encuentran en el sustrato. (Arditti *et al.*, 1972; Ernst y Rodríguez, 1984; Smreciu y Currah, 1989; Arditti *et al.*, 1990). Los hongos asociados con las orquídeas pueden ser auténticos saprófitos que viven de la degradación de detritos orgánicos en el suelo o de ser parásitos de otras plantas. De hecho, entre los hongos que forman micorrizas con orquídeas se encuentran algunos patógenos severos de otras plantas, como *Rhizoctonia solani*, causante de pudriciones y otras enfermedades (Hágsater *et al.*, 2005). Muchos hongos aislados de la micorriza de orquídeas maduras pertenecen a los géneros *Rhizoctonia*, *Ceratobasidium*, *Thanatephorus*, *Tulasnella*, *Sebacina*, *Agricales*, entre otros (Smreciu y Currah, 1989; Currah *et al.*, 1997). Algunas especies del hongo endofítico del género *Rhizoctonia* mostraron que los carbohidratos que solubilizan son trehalosa, glucosa y manitol; mientras que en otras especies de hongos consisten en glucosa, fructosa y sacarosa (Ernst y Rodríguez, 1984; Peterson y Currah, 1990; Leroux *et al.*, 1995; Markovina y McGee, 2000).

Es de resaltar el hecho de que existen al menos unas 200 especies de orquídeas en el mundo que carecen de clorofila y no realizan fotosíntesis, por lo que su única fuente de nutrición son sus hongos simbioses. Estas orquídeas han sido consideradas saprófitas, pero hoy día se sabe que en realidad son “micótrofas” o “micoheterótrofas”, lo que significa que su nutrición depende de una fuente externa, específicamente de hongos. Existen indicios de que algunas de ellas son “epiparásitas”, viviendo a expensas de los hongos que a su vez parasitan o forman micorrizas con las raíces de otras plantas (Hágsater *et al.*, 2005).

El primer contacto entre el hongo y la semilla de orquídea, es fortuita, ya que no existen evidencias de que la semilla produzca alguna sustancia que provoque que el hongo la invada.

Primero, la hifa del hongo penetra la epidermis de la semilla; una vez dentro, la hifa del hongo penetra las células basales del suspensor, formado por las últimas células del embrión; en algunas especies la infección ocurre a través de los tricomas epidérmicos; posteriormente una o más hifas penetran las paredes de las células. Esta infección crece dentro de las células del suspensor y penetra en las paredes de las células corticales adyacentes. En las células del cortex la hifa del hongo se ramifica en el citoplasma formando pelotones. La presencia de pelotones en el embrión es el primer indicio de la

compatibilidad del hongo con la semilla de la orquídea y entonces puede comenzar la germinación (Clements, 1988; Richardson *et al.*, 1992; Harrison, 1999).

El crecimiento del hongo dentro del protocormo es controlado mediante sustancias reguladoras producidas por la orquídea llamadas fitoalexinas (Arditti, 1992; Hágsater *et al.*, 2005).

En el comienzo de la germinación simbiótica, se observa una actividad meristemática en el polo apical; esto es uno de los primeros signos anatómicos de la germinación. En este estado, las reservas lipídicas y proteínicas parecen completamente desaparecidas; se encuentran entonces una gran cantidad de almidón. El proembrión es ahora calificado como protocormo. El polo apical toma una forma de domo, después de múltiples divisiones celulares. El domo meristemático crece y viene a ser un promeristemo. Posteriormente una invaginación en la parte basal delimitará el ápice de la cofia. El ápice y la cofia se desarrollan de manera sincronizada, al mismo tiempo el sistema vascular comienza a diferenciarse en dirección basípeta en la parte central del protocormo.

La parte central del protocormo está cubierta de estomas y de pelos absorbentes. Los primordios foliares se desenvuelven en la parte del ápice.

Más tarde el protocormo toma una forma más o menos irregular. Desde la formación del talluelo, las células del polo basal degeneran gradualmente. Más tarde, el protocormo degenera totalmente para dejar lugar a la plántula. (Clements, 1988; Leroux *et al.*, 1995; Hágsater *et al.*, 2005).

En este momento la plántula es capaz, al menos en potencia de vivir de manera autónoma, aunque la infección puede “migrar” a las jóvenes raíces y transformarse en una micorriza en sentido estricto. Esta fase de plántula como protocormos micoheterotróficos parece ser una característica exclusiva de las orquídeas (Hágsater *et al.*, 2005).

La mayor parte de la información de los requerimientos de una fuente exógena de carbohidrato y de la fisiología de la germinación han sido obtenidos en experimentos llevados a cabo en condiciones asimbióticas. (Arditti y Ernst, 1984; St-Arnaud, 1992; Leroux *et al.*, 1995; Markovina y McGee, 2000; Vujanovic *et al.*, 2000). Knudson en 1922 demostró que algunas orquídeas de los géneros *Cattleya*, *Laelia* y *Epidendrum* pueden germinar asimbióticamente en un medio de cultivo que contenía azúcar y minerales

(Ariditti, 1966; Arditti y Ernst, 1984; Arditti *et al.*, 1990; Leroux *et al.*, 1995; Tomita y Tomita, 1997; Markovina y McGee, 2000).

Estudios comparativos han encontrado que los requerimientos de carbohidratos durante la germinación varían dentro de la misma familia. Sin embargo, es una necesidad para las orquídeas una fuente exógena de carbohidrato (Harrison y Arditti, 1978; Leroux *et al.*, 1995; Vujanovic *et al.*, 2000; Hágsater *et al.*, 2005).

Harrison (1977); Harrison y Arditti (1978) y Arditti y Ernst (1984) comprobaron que una vez que las plántulas tienen una o dos hojas ya no es necesario el aporte de carbohidrato ya que las plántulas son capaces de realizar la fotosíntesis. Esto se demostró colocando semillas de *Cattleya aurantiaca* en un medio de cultivo Knudson C con sacarosa (KC+SAC), posteriormente, las semillas hinchadas y los protocormos fueron transferidos en diferentes tiempos de cultivo (3, 5, 9, 14, 21, 30, 39, 41, 47, 55 y 60 días) a un medio de cultivo KC sin sacarosa (KC-SAC) donde permanecieron hasta el final del experimento. En otro estudio, las semillas primero estuvieron en un medio KC-SAC y después de 15, 30 y 60 días de cultivo las semillas hinchadas y los protocormos fueron transferidos al medio KC +SAC, posteriormente fueron retornadas a un medio de cultivo KC-SAC en intervalos de tiempo de 2, 8, 12, 18, 25, 42 y 55 días.

En el primer experimento concluyeron que el porcentaje de protocormos transferidos que formaron hojas y posteriormente plantas completas fue directamente proporcional al tiempo de permanencia en un medio de cultivo KC+SAC.

En el segundo experimento, las semillas que germinaron y crecieron después de permanecer 15, 30 o 60 días en un medio de cultivo KC-SAC requieren de 21-30 días de crecimiento posterior en un medio de cultivo KC+SAC para que el 50% forme plantas completas después de ser transferido nuevamente a un medio de cultivo KC-SAC.

Los carbohidratos D-hexosas y sus pequeños oligosacáridos pueden ser usados para la germinación de semillas de orquídea, siendo D-galactosa la excepción ya que es tóxica para ellas.

Las semillas de orquídea pueden germinar y desarrollarse en un medio que contenga azúcares relativamente simples, ya que en la naturaleza las semillas son incapaces de utilizar largas moléculas sin la ayuda de un hongo que pueda romper estas moléculas y

transformarlas en azúcares más simples como por ejemplo fructosa (Ernst *et al.*, 1971; Bechtel *et al.*, 1986; Leroux *et al.*, 1995).

EFFECTO DE LA FRUCTOSA DURANTE LA GERMINACIÓN

Las semillas de las diferentes especies de orquídeas tienen la capacidad de utilizar para su germinación varios carbohidratos, aunque es común que muestren alguna preferencia por algún carbohidrato en especial; en diversos estudios se ha demostrado que hay especies que germinan *in vitro* únicamente si está presente un determinado carbohidrato o cuando existe una mezcla entre algunos de ellos (Arditti, 1967). Los carbohidratos que se utilizan comúnmente como promotores de la germinación son: fructosa, glucosa, lactosa, sacarosa, maltosa, manitol, rafinosa y melecitosa (Ernst *et al.*, 1971).

Algunos estudios muestran que la fructosa provee una fuente adecuada de carbono para semillas jóvenes. Así lo demuestran Knudson en 1916, 1922, 1941 y 1950 para los géneros epífitos. LaGarde (1929) y Wynd (1933) para *Catleya trianaei*, Burgeff (1936) con orquídeas epífitas, y una mezcla de fructosa y glucosa para *Paphiopedilum*, Downie (1940) con *Godyera repens*, Tomale (1954) con *Paphiopedilum* (Withner, 1988), Ernst en 1971 y Arditti *et al* 1972 para semillas y protocormos del Género *Phalaenopsis*. Al igual que varios reportes indican que un gran número de especies de orquídea germinan y crecen bien en fructosa (Arditti, 1967; Burgeff, 1936 y Withner, 1959 citado en Arditti y Ernst, 1984).

Ernst y Rodríguez (1984) señalan que bajas concentraciones de fructosa no permiten los efectos osmóticos en las células.

EFFECTO DE LA FRUCTOSA EN LA GERMINACIÓN DE *Laelia speciosa*

Knudson obtuvo la germinación asimbiótica del híbrido *Laelio-Cattleya* utilizando un medio de cultivo nutritivo que contenía glucosa y fructosa adicionado con minerales y extracto orgánico (Whitner, 1988).

Luna y Barba (1993) reportan que cuando se utilizan glucosa y fructosa como fuentes exógenas de carbohidrato en la germinación de *Laelia speciosa* se favorece el

desarrollo morfológico de los embriones. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que la respuesta más rápida se obtiene con glucosa.

Velázquez (1997) cita que la fructosa es un buen carbohidrato promotor de la germinación y del desarrollo de las semillas, así como también promueve la proliferación de brotes y raíces, y que en concentraciones de 1, 3 y 5.0% de fructosa se observa un mayor desarrollo en las semillas de *Laelia speciosa*.

Buentello *et al.* (1997) mencionan que un medio adicionado con fructosa esterilizada por filtración induce la respuesta morfogénica del embrión alcanzando un desarrollo hasta plantas completas. Neyra y Rosas (1998) observaron que la fructosa induce la germinación y desarrollo de los embriones de *Laelia speciosa*, obteniendo un porcentaje de germinación de 89%, y que treinta y ocho días de exposición de las semillas sobre fructosa esterilizada por filtración es el tiempo mínimo requerido por los embriones para inducir un máximo desarrollo de plántulas.

DESCRIPCIÓN DEL GÉNERO *Laelia*

El género *Laelia* es uno de los más amplios del continente Americano, se extiende desde Cuba y México hasta Brasil y Argentina (Wiard, 1987), El género *Laelia* incluye algunas de las orquídeas más bellas y mejor conocidas; y es uno de los rasgos más característicos de la flora de México. Nuestro país posee 11 especies dentro de éste género.

El género *Laelia* fue establecido en 1831 por el botánico inglés John Lindley, basándose en las especies mexicanas *Laelia speciosa* y *autumnalis*. El nombre genérico probablemente fue dedicado a una de las vírgenes vestales de la antigua Roma, o quizá al nombre femenino “Laelia” de aquella época. Para los estudiosos de la orquideología, la característica principal que distingue a todas las especies de *Laelia* es que las flores tienen 8 polinios, comparados con los 4 polinios que tienen las flores del género más cercano, *Cattleya* (Halbinger, 1993; Halbinger y Soto, 1997).

Las laelias evocan el concepto popular de orquídea; son muy bellas, muchas son abundantes y además fáciles de cultivar. No es sorprendente que en México sean las orquídeas por antonomasia y ocupen un lugar privilegiado en la cultura, son las flores de las

principales celebraciones religiosas, de los bautizos, de las bodas y también las que se ofrecen a los difuntos (Hágsater *et al.*, 2005)

Las laelias mexicanas son en su mayoría habitantes de las serranías. Casi todas las especies mexicanas se distribuyen en las sierras del occidente del país (la Sierra Madre Occidental, el Eje Volcánico y la Sierra Madre del Sur), mientras que en las sierras de la vertiente del Golfo de México, en la Sierra Madre Oriental, hay una sola especie. Se puede interpretar al Istmo de Tehuantepec como una barrera natural para este género, ya que sólo dos especies, se encuentran en ambos lados (Halbinger, 1993; Halbinger y Soto, 1997).

Se observa que, básicamente la mayoría de las laelias prefieren como árboles hospederos a las numerosas especies de encinos (*Quercus*), que forman bosques abiertos, caducifolios, desde los 100 a los 2700 m de altitud sobre el nivel del mar; en estos bosques las orquídeas reciben mucha luz. Desde luego también otros árboles albergan laelias y ocasionalmente pueden encontrarse sobre rocas en condiciones favorables, como en la cercanía de un arroyo o en lo alto de las montañas, donde llegan los vientos húmedos.

La época de floración de las distintas especies de laelias de México se extiende prácticamente durante todo el año, con la mayoría de ellas floreciendo en otoño (Halbinger, 1993; Halbinger y Soto, 1997).

DESCRIPCIÓN DE *Laelia speciosa*

Algunos nombres que recibe *Laelia speciosa* son: *Laelia grandiflora* (La Llave y Lex) Lindl, *Laelia majalis* Lindl, *Cattleya grahamii* Lindl, y se le conoce comúnmente como “flor de mayo”, “flor grande”, “flor de corpus”, “tlacuxochitl”, “deantza”, “itzamahua” y “chichiltictopetzacuxochitl”.

Laelia speciosa es una de las primeras orquídeas mexicanas que se citan en la literatura científica, se le considera como una de las más bellas especies del género y quizá una de las más notables de todas las orquídeas; son plantas epífitas, más bien pequeñas, con pseudobulbos globosos u ovoides, con una hoja rígida terminal. La inflorescencia de 15 a 25 cm., con 1 a 2 flores muy grandes que miden 10 a 16 cm de diámetro, de color rosa-lila, claro hasta oscuro. Los sépalos son lanceolados y los pétalos son del doble de ancho; el

labelo blanco en el centro, con líneas rojas; el lóbulo medio del labelo casi redondo, rosalila en los bordes, el centro más claro y con un diseño más o menos de puntos y rayas, de color púrpura (figura 1).

Laelia speciosa es endémica de México y se distribuye en los bosques de encino de la Sierra Madre Occidental, Oriental, el Eje Neovolcánico Transversal y montañas adyacentes. Puede encontrarse en un territorio muy extenso de México, en los estados de Durango, Zacatecas, Aguascalientes, Jalisco, Guanajuato, Michoacán, Querétaro, Hidalgo, San Luis Potosí y Tamaulipas; raramente ha sido reportada para Veracruz, Oaxaca y Guerrero (Halbinger y Soto, 1997; Ávila y Oyama, 2002).

Las plantas crecen sobre encinos (casi siempre en *Quercus deserticota* y *Quercus laeta*) en bosques caducifolios, achaparrados y abiertos, de 1900 a 2500 m de altitud. Soportan largas sequías de diciembre a junio y toleran cortos períodos con temperaturas abajo de 0° C (Halbinger y Soto, 1997).

La época de floración de *Laelia speciosa* es de abril a junio (Caneva, 1978; Wiard, 1987 Halbinger, 1993; Halbinger y Soto, 1997).

Laelia speciosa es una planta que todo lo hace muy lentamente. Una plántula necesita en promedio de 16 a 19 años para florecer por primera vez, aunque este periodo juvenil puede extenderse en total entre nueve y 32 años. Las plantas no florecen cada año, aunque las más viejas si pueden hacerlo. *Laelia speciosa* vive hasta 56 años o más, ya que cuando las plantas se vuelven más viejas es más difícil calcular su edad. Un fruto de flor de Corpus tiene de 250 000 a 1 000 000 de semillas, de las cuales una en 5 000 a una en 20 000, dependiendo del sitio, es capaz de germinar. La germinación no se lleva a cabo en cualquier lugar, sino que sólo se da en ramas de tocuz (*Quercus deserticola*) cubiertas por líquenes del género *Parmelia*. Las plantas que germinan tienen muchas probabilidades de sobrevivir y entre 68 y 88% de ellas sigue viva 17 meses después de haber germinado. Después de este periodo la mortalidad de los juveniles es relativamente baja y más o menos constante hasta llegar a la etapa reproductiva.

Las flores de corpus no producen néctar ni fragancia; no ofrecen ninguna recompensa a sus polinizadores, que son abejorros del género *Bombus*, cuyos servicios son necesarios para la reproducción de la orquídea, pues las flores no se autopolinizan. Los abejorros son atraídos sin duda por lo vistoso de las flores, que destacan entre las ramas casi sin hojas de los encinos, justo al final de la época de sequía. Se cree que en determinado momento los abejorros aprenden que las laelias no ofrecen recompensa y dejan de visitarlas. La producción de semillas se basa en el engaño y sólo el 15% de las flores llega a formar frutos, pero aún así el nivel de polinización es suficiente para mantener una población vigorosa, es decir, que sigue habiendo más nacimientos que muertes (Hágsater *et al.*, 2005).

De acuerdo con la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN), el apéndice dos de CITES para plantas de medio silvestre, la norma oficial NOM-059-ECOL-2001 para la protección ambiental de especies nativas de México de flora y fauna silvestres publicada en el Diario Oficial el día 6 de marzo del 2002, *Laelia speciosa* es una especie sujeta a protección especial debido a que es una especie amenazada, esto quiere decir que podría pasar a la categoría de extinta en un futuro cercano si los factores causales continúan operando. Estos factores causales pueden ser entre otros: la sobreexplotación, la destrucción intensiva del hábitat y su importancia hortícola (Soto y Hágsater, 1990; NOM-059-ECOL-2001; Eccardi y Becerra, 2003; Hágsater *et al* 2005).

En las poblaciones de *Laelia speciosa* donde se colectan las flores para el comercio se interrumpe completamente la producción de semillas, ya que con frecuencia se extraen todas las flores de un sitio y no hay oportunidad para que se forme algún fruto. Se han visto sitios donde no ha germinado ninguna semilla de “Corpus” hasta en siete años. El resultado es que en estas poblaciones no hay nacimientos y sin embargo, sí hay muertes. Como no hay nuevos individuos que replacen a los que van muriendo, estas poblaciones llegarán a desaparecer (Hágsater *et al.*, 2005).

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Hágsater *et al.* (2005) establecen la siguiente clasificación taxonómica para *Laelia speciosa*:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Aspargales

Familia: Orchidaceae

Subfamilia: Epidendroideae

Tribu: Epidendreae

Subtribu: Laeliinae

Género: *Laelia*

Especie: *Laelia speciosa*

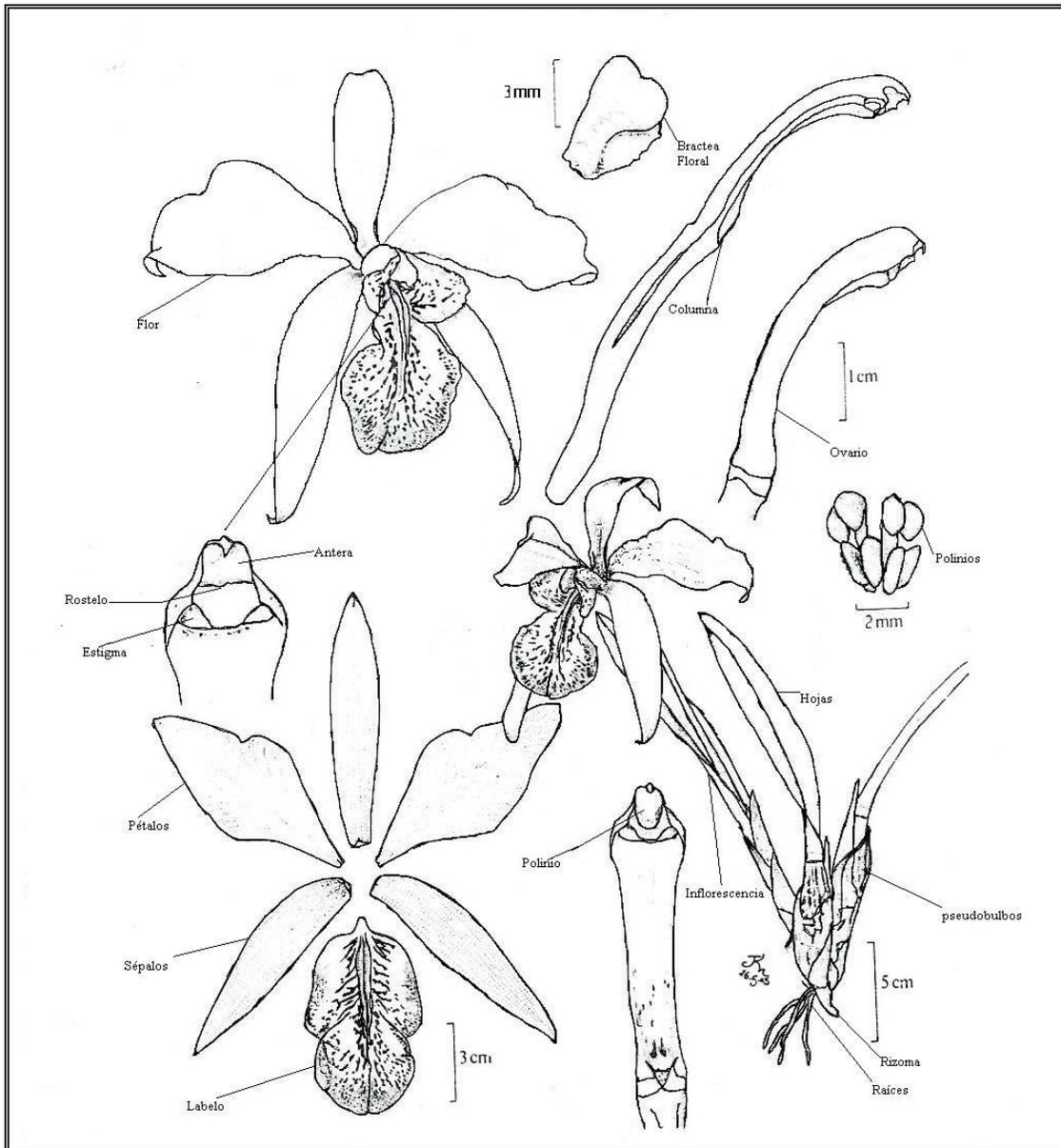


Fig. 1. *Laelia speciosa* (tomado de Halbinger y Soto, 1997).

OBJETIVOS

General:

- Determinar el efecto del estímulo limitado de fructosa en el proceso de germinación *in vitro* de *Laelia speciosa*.

Particulares:

- Establecer la respuesta morfogénica del embrión durante su germinación asimbiótica *in vitro* con fructosa.

- Determinar el tiempo mínimo requerido del estímulo con fructosa para inducir el desarrollo del embrión.

- Evaluar la formación de plantas completas con y sin el estímulo de fructosa.

- Evaluar el efecto sobre la germinación del procedimiento de esterilización de la fructosa.

- Determinar el efecto del estímulo retardado de la fructosa en la germinación.

HIPÓTESIS

Sin una fuente de carbono y energía disponible en el momento y lapso adecuado las semillas de orquídea no pueden continuar su desarrollo, una vez alcanzado el estadio de protocormo. Por lo tanto al exponerlas a un estímulo temporal de fructosa éstas continúan su desarrollo hasta el estadio de plántula completa.

MATERIAL Y MÉTODOS

RECOLECTA DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron semillas maduras de *Laelia speciosa*, provenientes de cápsulas sanas indehiscentes colectadas en campo (Coenembo, Mich. Méx.), con edad aproximada de nueve meses, presentando una coloración verdosa. Estas cápsulas se trasladaron al laboratorio en bolsas de papel estraza para su procesamiento. Posteriormente se introdujeron en frascos de vidrio, los cuales se taparon con tela de muselina, colocándose posteriormente dentro de un desecador con cloruro de calcio anhidro para reducir la humedad.

PRUEBA DE VIABILIDAD

Para eliminar la posibilidad de utilizar semillas con baja respuesta, se determinó la viabilidad de las semillas, por medio del método bioquímico del TTC (cloruro de trifeniltetrazolio) (Moreno, 1984; Vujanovic *et al.*, 2000; Ortiz, 2001). Se utilizaron cuatro frutos y de cada uno se tomaron 14 lotes de semillas que fueron colocadas en sobres de papel filtro (2x2 cm). Los sobres se sumergieron en etanol al 70% durante cinco minutos para su desinfección, posteriormente se transfirieron a hipoclorito de sodio al 0.6% a diferentes intervalos de tiempo: 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos, con el fin de lograr una mayor permeabilidad de la testa al tetrazolio. Una vez cubierto el tiempo de permanencia en el cloro se enjuagaron tres veces con agua destilada para después colocarlos en una solución de tetrazolio al 1% durante 24 h en oscuridad a una temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Una vez transcurridas 24 h los sobres fueron retirados de la solución de tetrazolio y se enjuagaron tres veces con agua destilada.

Por fruto se tomaron al azar dos sobres con aproximadamente 50 semillas y de cada uno se registró el número de semillas teñidas para posteriormente calcular el porcentaje de viabilidad de cada lote de semillas mediante un rango de tolerancia máximo de acuerdo a Moreno (1984).

PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO MS

El medio nutritivo básico utilizado para la germinación *in vitro* de las semillas de *Laelia speciosa* fue el Murashige y Skoog (MS) en una mezcla de sales basales marca Sigma, también se adicionaron mio-inositol y vitaminas. Se utilizó agar gel como agente solidificante (cuadro 2). Se ha demostrado que este medio de cultivo proporciona los nutrientes necesarios para promover el desarrollo de plántulas completas en semillas de orquídeas (Arditti, 1967, Harrison y Arditti 1978; Arditti y Ernst 1984; Arditti, 1992; Velásquez, 1997; Neyra y Rosas, 1998).

Cuadro 2. Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog utilizado para la germinación de *Laelia speciosa*.

SALES BASALES MS	CONCENTRACIÓN
1) MACRONUTRIENTES	mg/L
NH ₄ NO ₃	1650
MgSO ₄	180.7
KH ₂ PO ₄	170
KNO ₃	1900
CaCl ₂	332.2
2) MICRONUTRIENTES	
ZnSO ₄	8.6
CoCl ₂	0.025
H ₃ BO ₃	6.02
MnSO ₄ H ₂ O	16.9
CuSO ₄ 5 H ₂ O	0.025
Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	0.25
KI	0.83
EDTA Na ₂ 2 H ₂ O	37.26
FeSO ₄	2708
3) MIO-INOSITOL	100
4) VITAMINAS	
Tiamina HCl	0.4
Niacina	0.5
Piridoxina HCl	0.1
5) Agar-gel (SIGMA)	5000

CARBOHIDRATO EXPERIMENTAL

Las semillas de *Laelia speciosa* se expusieron temporalmente al medio suplementado con fructosa para determinar el tiempo mínimo requerido de este estímulo para inducir la morfogénesis de hojas y raíces en los embriones.

La fuente de carbono exógena experimental para la germinación asimbiótica de las semillas de *Laelia speciosa* fue la fructosa en una concentración de 30 g/L, ya que de acuerdo con Velásquez (1997) esta concentración promueve un mayor estímulo para la germinación, así como para la proliferación de brotes y raíces para esta especie. La fructosa se esterilizó en autoclave y por filtración, para observar el efecto de la temperatura y la presión por tipo de esterilización, en la capacidad de estimulación morfogénica de la fructosa.

Los medios de cultivo, sin fructosa (MS-F), así como el medio con fructosa (MS+F) fueron vaciados a tubos de ensayo en una cantidad de 15 mL y esterilizados en el autoclave bajo condiciones estándar de 1atm de presión y a una temperatura de 121° C durante 15 minutos (Abraham y Vetsala, 1981). Al medio de cultivo MS+F esterilizado por filtración se le adicionó el carbohidrato (disuelto previamente) con una jeringa hipodérmica acoplada a un filtro de membrana de 0.45 μ . Este proceso se llevó a cabo en condiciones estériles y dentro de una campana de flujo laminar. En total se prepararon tres tipos de medios de cultivo: el medio MS-F y el MS+F esterilizados en autoclave y otro medio MS+F esterilizado por filtración

Los medios de cultivo fueron ajustados a un pH de 5.7 por medio de un potenciómetro digital (Corning) con la adición de una solución de ácido clorhídrico (HCl) al 1.0 Normal o una solución básica de hidróxido de sodio (NaOH) al 1.0 Normal, según se requiriera.

SIEMBRA E INCUBACIÓN DE LAS SEMILLAS

El proceso de siembra se llevó cabo en un cuarto previamente esterilizado con luz UV, del cual todas las superficies de contacto se limpiaron con etanol al 70%, incluyendo la campana de flujo laminar y todo el material utilizado para la siembra.

Se elaboraron 360 sobres con papel filtro Wathman (2x2 cm), y en cada sobre se colocaron aproximadamente 50 semillas de *Laelia speciosa* asegurando los sobres con una pinza metálica.

Las semillas en los sobres se desinfectaron en una solución de etanol al 70% durante cinco minutos, para después transferirlas a una solución de hipoclorito de sodio al 0.6% durante 10 minutos y por último se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Cada sobre se abrió y se colocó dentro de un tubo de ensayo, para dejar expuestas las semillas y en contacto con el medio de cultivo MS-F.

Los 360 tubos de ensayo con las semillas se colocaron en una sala de incubación a una temperatura de $25^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$, con una intensidad luminosa de 4670 lux, se utilizaron seis lámparas fluorescentes con una intensidad de 75 watts cada una y un fotoperíodo de 16 horas luz por 8 de oscuridad.

DISEÑO EXPERIMENTAL

El tratamiento inicial para la germinación de semillas de *Laelia speciosa* consistió en exponer las semillas al medio de cultivo sin fructosa (MS-F) durante cuatro tiempos 15, 30, 45 y 60 días, con un total de 90 repeticiones (tubos) por tiempo (cuadro 3 y 6).

Cuadro 3. Tratamiento inicial para germinación y desarrollo de semillas de *Laelia speciosa* en el medio de cultivo sin fructosa (MS-F).

TIEMPO DE DURACIÓN SIN ESTÍMULO (DÍAS)	REPETICIONES
15	90
30	90
45	90
60	90

Transcurridos los diferentes tiempos de exposición de las semillas en el medio sin fructosa (MS-F), la mitad de las repeticiones del tratamiento inicial (45 de las 90 repeticiones por tiempo en MS-F) de cada uno de los tiempos de duración, fueron transferidos temporalmente a los dos medios de cultivo adicionados con fructosa (MS +F), el primero esterilizado por filtración y el segundo esterilizado por autoclave (cuadro 4 y 6).

Se establecieron los siguientes tiempos 7, 15, 21, 30, 38, 45, 52 y 60 como días de permanencia de las semillas (con cinco repeticiones por tiempo) en los medios con fructosa

(MS+F) esterilizados por filtración y por autoclave (cuadro 4 y 6). Una vez que las semillas de cada tiempo completaron los días establecidos de exposición en el medio con fructosa (MS+F) para cada uno de los tipos de esterilización, como tratamiento final éstas se transfirieron nuevamente al medio sin fructosa (MS-F) en donde se mantuvieron en cultivo hasta completar un total de 154 días, a excepción de cinco repeticiones por tiempo de exposición al estímulo y por tipo de esterilización que permanecieron 94, 109, 124 y 139 días en el medio con fructosa (MS+F) (cuadro 5 y 6).

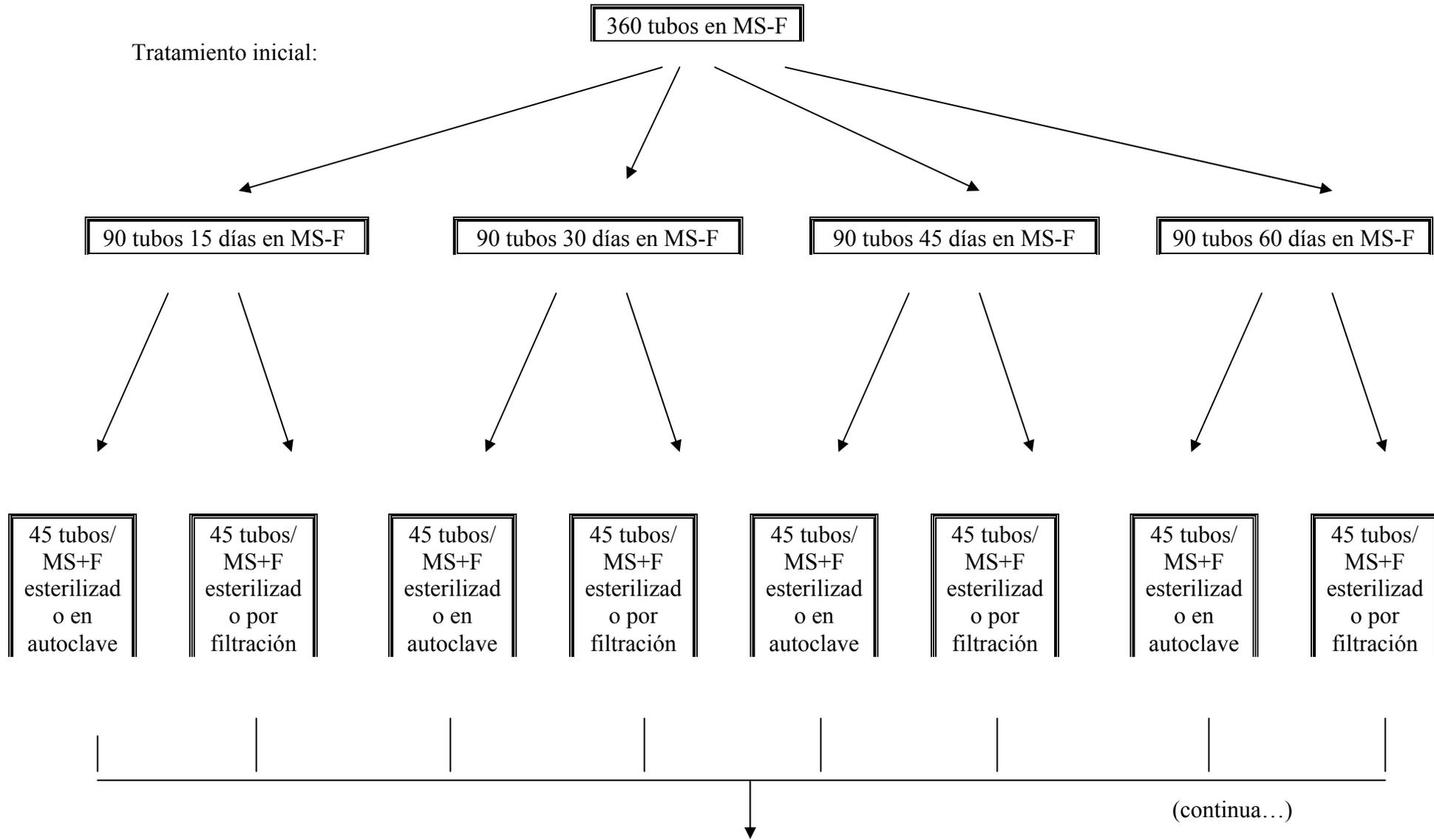
Cuadro 4. Tratamiento de exposición temporal de las semillas *de Laelia speciosa* en el medio de cultivo con fructosa (MS+F).

TIEMPO EXPOSICIÓN (DÍAS)\TIPO DE ESTERILIZACIÓN	REPETICIONES	
	AUTOCLAVE	FILTRACIÓN
7	5*	5
15	5	5
21	5*	4
30	5	5
38	5	5
45	5	5
52	5	5
60	5	5

Cuadro 5. Tratamientos de exposición permanente en el medio con fructosa

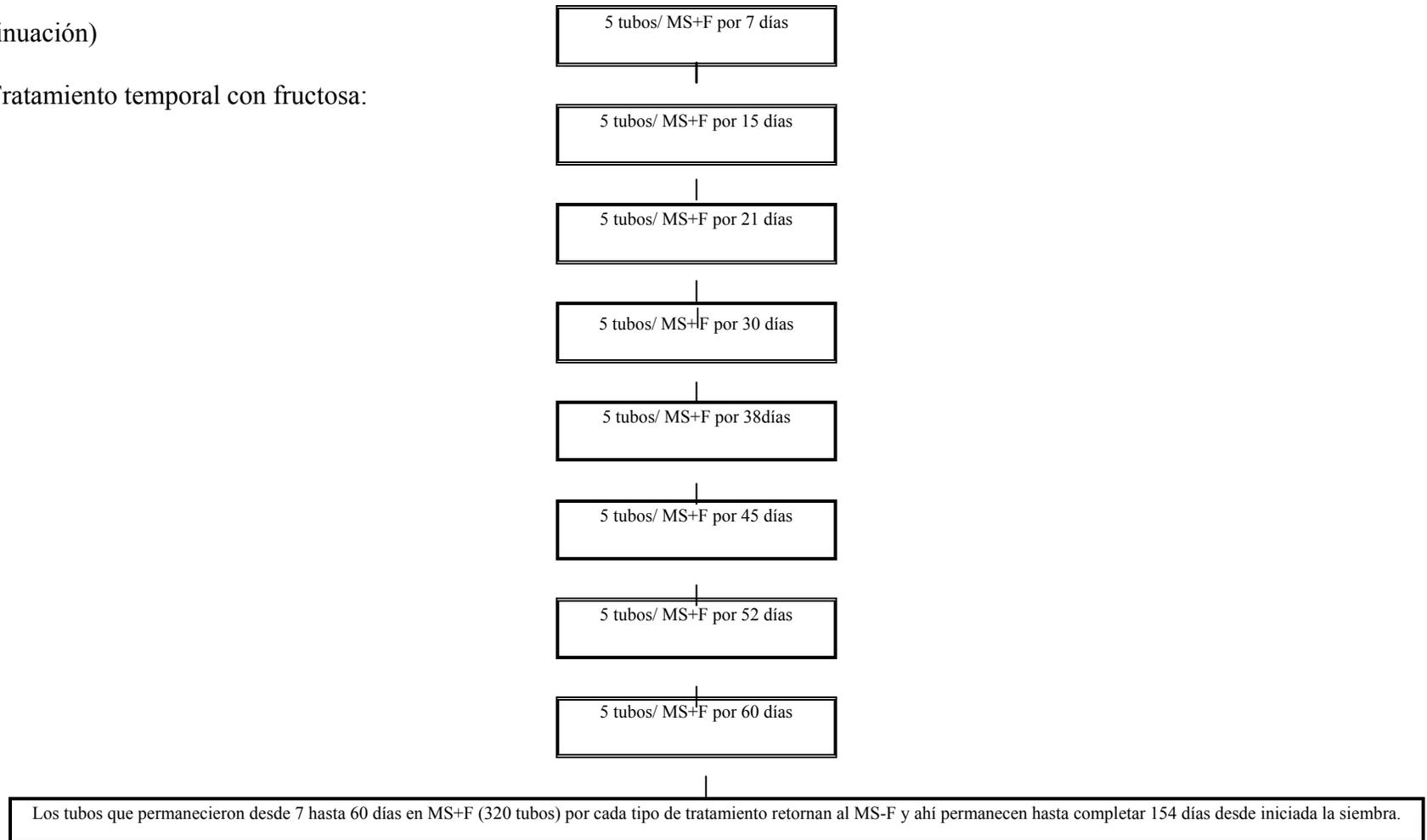
TIEMPO DE EXPOSICIÓN		MS+F	
		REPETICIONES POR TIPO DE ESTERILIZACIÓN	
-F	+F	AUTOCLAVE	FILTRACIÓN
15	139	5	5
30	124	5	5
45	109	5	5
60	94	5	5

Cuadro 6. Diagrama de flujo del diseño experimental.

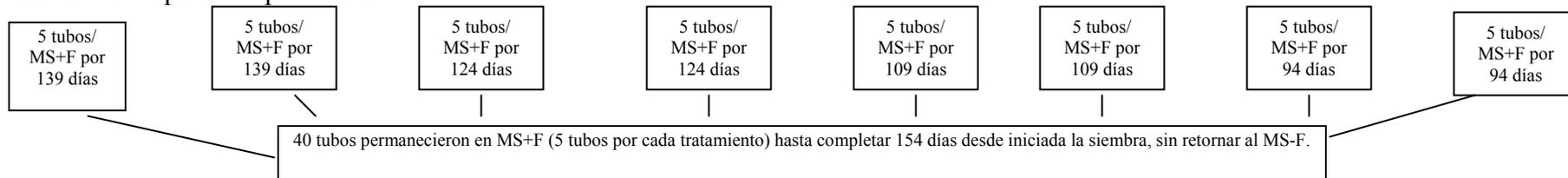


(...continuación)

Tratamiento temporal con fructosa:



Tratamiento de exposición permanente a la fructosa



EVALUACIÓN DE GERMINACIÓN Y DESARROLLO

Para evaluar de forma cuantitativa a las semillas en sus diferentes etapas de desarrollo se tomó en cuenta la descripción y el valor numérico que Arditti (1966) y Harrison y Arditti (1978) le designan a cada estadio de desarrollo (cuadro 7).

Germinación. La determinación en forma directa de la viabilidad de las semillas así como el cambio en el estado del embrión se obtuvo calculando el porcentaje de germinación, que se cuantificó como la suma del número total de individuos de cada etapa o estadio de desarrollo a partir de la semilla hinchada (estadio 2) hasta planta con raíz verdadera (estadio 6), expresado como un porcentaje del total de individuos de todos los estadios de cada repetición por tratamiento. Se evaluó cada siete días hasta completar 154 días de cultivo.

Índice de desarrollo. Para seguir el desarrollo de forma cuantitativa y establecer la respuesta morfogénica del embrión durante su germinación al utilizar temporalmente fructosa esterilizada en autoclave y por filtración, cada siete días se observaron y contaron las semillas, embriones, protocormos o plántulas en cada repetición de cada uno de los tratamientos. Se les asignó un valor a cada estadio de desarrollo del embrión durante 154 días (cuadro 7).

El índice de desarrollo se calculó, para cada repetición, registrando la frecuencia de cada valor expresado como un porcentaje del número total de individuos evaluados. Los porcentajes fueron multiplicados por valor de sus respectivos estadios asignados, finalmente se sumaron y el total se consideró como el valor del índice de desarrollo.

$$ID = \sum_{X=1}^{X=6} (e_x/e) (x) (100)$$

Donde:

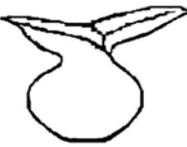
X = Número de estadio de desarrollo

e_x = Número de individuos registrados en ese estadio

e = Total de individuos de la muestra

Plántulas con raíz verdadera. Se determinó el porcentaje de plántulas con raíz verdadera (estadio 6) a los 154 días de iniciada la siembra en cada uno de las repeticiones por cada uno de los tratamientos de exposición.

Cuadro 7. Estadios del embrión de *Laelia speciosa* (tomado de Arditti, 1966 y Harrison y arditti ,1978).

ESTADIO	VALOR DEL ÍNDICE DE DESARROLLO	DESCRIPCIÓN	MORFOLOGÍA
1	100	Semilla sin germinar	
2	200	Semilla hinchada	
3	300	Protocormo	
4	400	Plántula con una hoja	
5	500	Plántula con dos hojas	
6	600	Plántula con raíz verdadera	

Diseño estadístico

A los resultados del porcentaje de germinación, índice de desarrollo y plántulas con raíz verdadera se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) por medio del programa estadístico “Statistical Analysis System” (SAS ver 8.0), para conocer si existieron diferencias significativas entre los tipos de esterilización de la fructosa y entre los tiempos de exposición de las semillas a esta, para determinar cual de los dos tipos fue el mejor para estimular el desarrollo morfogénico de los embriones, y así también establecer el tiempo mínimo requerido del estímulo de la fructosa de las semillas.

RESULTADOS

VIABILIDAD

El cuadro 8 indica las diferencias en viabilidad de las semillas por fruto. El fruto dos obtuvo el menor número de embriones teñidos con un 67%. El fruto uno y tres presentan una diferencia mínima entre ellos en la cantidad de embriones teñidos con un 86 y 88% respectivamente. El fruto cuatro presentó el 100% de embriones teñidos. Se obtuvo un porcentaje promedio de viabilidad de 85.2 del total de los embriones de los cuatro frutos.

Los resultados de la tolerancia máxima validan los porcentajes obtenidos en el análisis de las semillas de un mismo lote, en base a las tablas citadas por Moreno (1984).

La elección de los frutos se basó en el mayor porcentaje en la coloración desde rojo intenso hasta anaranjado de los embriones, indicativo de que las células estaban vivas (Shoushtari *et al*, 1994).

Los frutos elegidos para el presente estudio de acuerdo con los resultados (cuadro 8) fueron el fruto cuatro con el 100% y el fruto uno con un 88% de sus embriones con una coloración que iba desde el rojo intenso hasta un anaranjado.

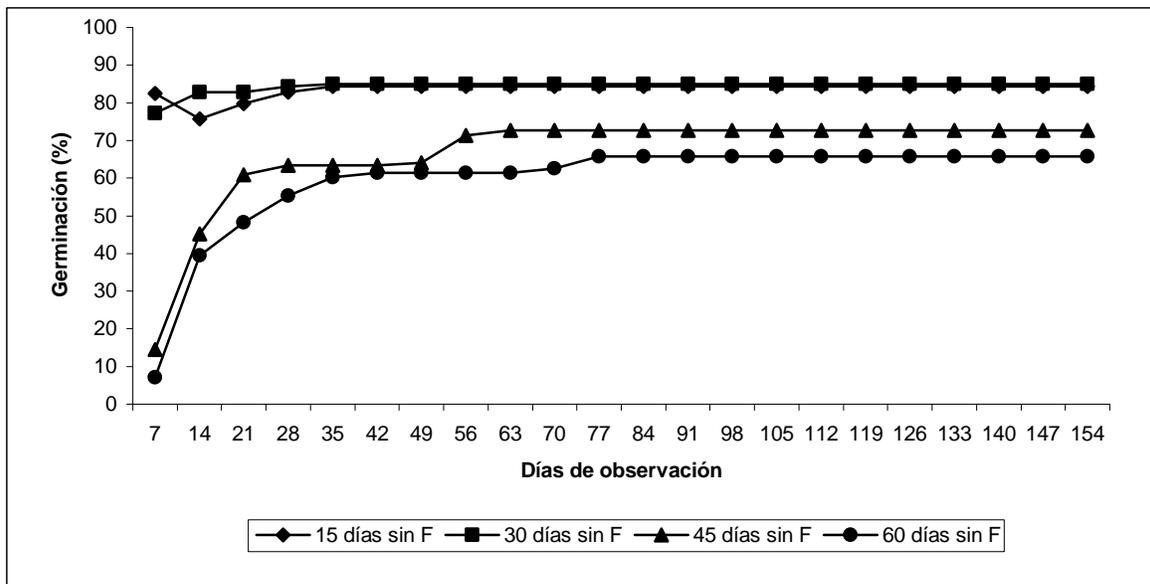
Cuadro 8. Viabilidad de las semillas de *L. speciosa* (H.B.K.) Schltr. Mediante la prueba de TTC.

FRUTO	VIABILIDAD (%)	TOLERANCIA MAXIMA
1	88	10
2	67	15
3	86	11
4	100	
	PROMEDIO 85.2	

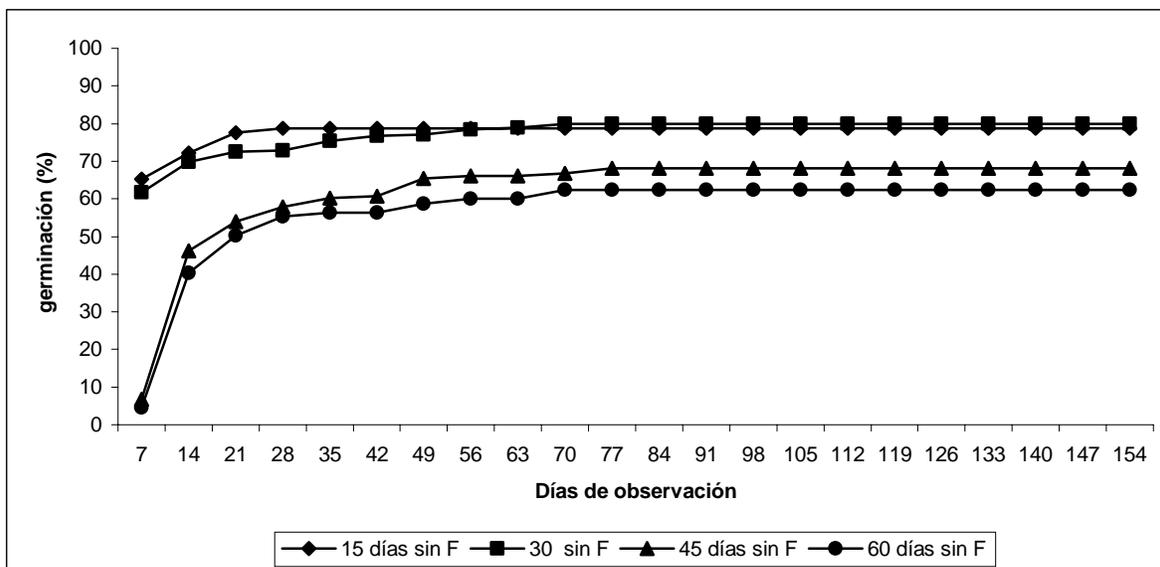
GERMINACIÓN

Efecto por la exposición inicial al medio MS-F y exposición temporal al MS+F

Con el análisis estadístico los porcentajes de germinación obtenidos (Gráfica 1 y 2) con el tratamiento inicial de exposición sin el estímulo de la fructosa, se observa que esta comienza a partir de los siete días de iniciada la siembra, existiendo diferencias significativas (Anexo 1 y 2) entre los tratamientos de exposición inicial en el medio MS-F de 15 y 30 días con los de 45 y 60 días desde los siete días de observación hasta los 154 días. Sin embargo, estas diferencias significativas son más evidentes a los siete y catorce días de observación, en donde el porcentaje de germinación mínimo obtenido fue de 7% para el tratamiento de exposición inicial en MS-F de 60 días y el porcentaje más alto fue de 82 % para el tratamiento de exposición inicial en MS-F de 15 días, posteriormente a partir de los 21 días los porcentajes de germinación casi se mantienen constantes (gráfica 1 y 2).

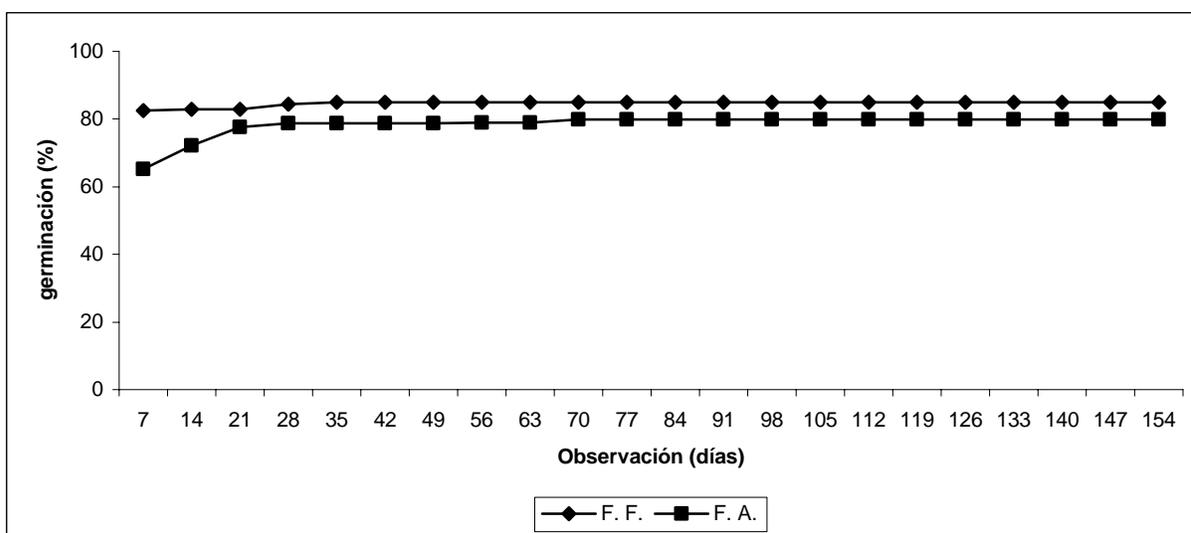


Gráfica 1. Germinación de las semillas de *Laelia speciosa* en los diferentes tratamientos de exposición al medio MS-F y MS+F esterilizada por filtración. Nota: F = Fructosa.



Gráfica 2. Germinación de las semillas de *Laelia speciosa* en los diferentes tratamientos de exposición al medio MS-F y MS+F esterilizada por autoclave. Nota: F = Fructosa.

Sin embargo, al realizar la comparación global de los porcentajes de germinación por tipo de esterilización de la fructosa durante los diferentes días de observación se obtuvo una gran diferencia a los siete días siendo el MS+F esterilizado por filtración el mejor (sólo para ese tiempo), sin importar el tiempo de exposición temporal a la fructosa, con más del 80% de germinación (gráfica 3).



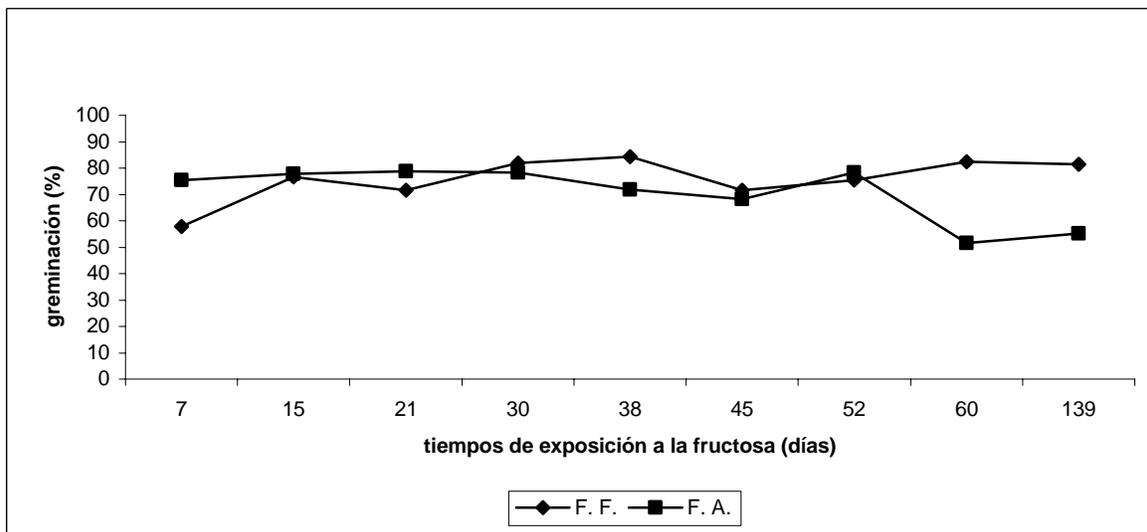
Gráfica 3. Germinación de las semillas de *Laelia speciosa* en los diferentes tratamientos de exposición al MS+F esterilizada por filtración y autoclave. Nota: F = Fructosa.

Efecto del estímulo con fructosa en semillas de *Laelia speciosa* expuestas inicialmente 15 días sin F.

Los porcentajes de germinación más altos obtenidos por el efecto del estímulo temporal de la fructosa esterilizada por filtración fueron 139, 60 y 38 días. Para las semillas que se mantuvieron en el estímulo temporal de la fructosa esterilizada por autoclave, el tiempo 52 obtuvo el porcentaje más alto (gráfica 4).

El tiempo de exposición temporal de 38 días al estímulo de la fructosa esterilizada por filtración con un porcentaje de 84% de germinación es el único significativamente diferentes ($P < 0.001$), en general, con respecto a los demás tiempos de exposición a la fructosa así como en el tipo de esterilización (Anexo 3).

De los nueve tiempos de exposición a la fructosa se observó que sólo las semillas expuestas durante 7, 60 y 139 días tuvieron una diferencia de hasta un 30% entre los dos tipos de esterilización, siendo mejor el tipo de esterilización por filtración; mientras que el resto del tiempo donde la diferencia fluctúa entre el 1 y el 3% (gráfica 4), indica que son estadísticamente iguales ($P > 0.001$).



Gráfica 4. Germinación por el efecto del estímulo temporal de la fructosa en las semillas de *Laelia speciosa* expuestas inicialmente 15 días en MS-F. Nota: F = Fructosa.

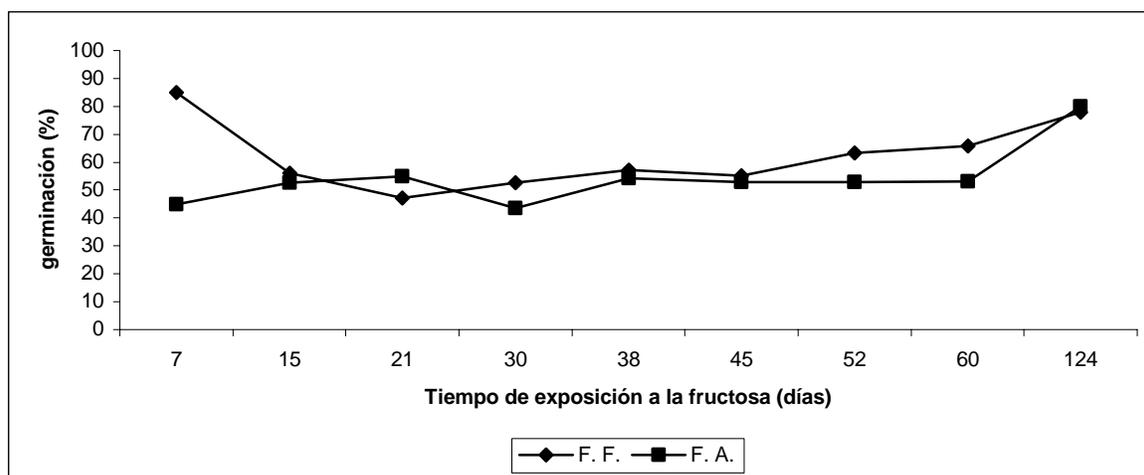
Efecto del estímulo con fructosa en semillas de *Laelia speciosa* expuestas inicialmente 30 días sin F.

El análisis estadístico muestra como las semillas que estuvieron expuestas a un medio de cultivo esterilizado por filtración obtienen los porcentajes más altos en un rango entre el 52 y el 85% con respecto a las que permanecieron expuestas a un medio de cultivo esterilizado por autoclave (gráfica 5).

El día 7 de exposición a la fructosa en el medio esterilizado por filtración obtuvo el porcentaje más alto con un 85% con respecto a los demás tiempos, así como entre los dos tipos de esterilización.

Las semillas que estuvieron en un medio de cultivo esterilizado por autoclave muestran que los tiempos de exposición a la fructosa 21 y 124, superaron a las que estuvieron en un medio esterilizado por filtración con porcentajes de 55 y 80% respectivamente.

Es notoria la diferencia de aproximadamente un 40% entre los dos tipos de esterilización en el día 7 de exposición a la fructosa, lo que es indicativo de que este tiempo de exposición al carbohidrato es estadísticamente diferente entre los tipos de esterilización y entre los días de exposición a la fructosa (Anexo).



Gráfica 5. Germinación por el efecto del estímulo temporal de la fructosa en las semillas de *Laelia speciosa* expuestas inicialmente 30 días en MS-F. Nota: F = Fructosa.

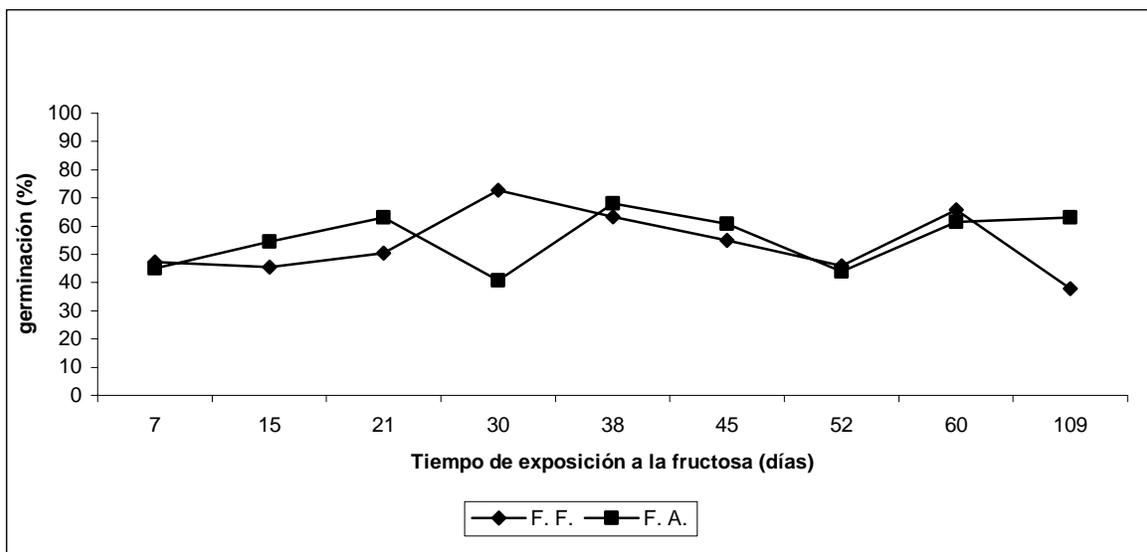
Efecto del estímulo con fructosa en semillas de *Laelia speciosa* expuestas inicialmente 45 días sin F.

En la gráfica 6 se observa un comportamiento similar en los tiempos de exposición a la fructosa entre los tipos de esterilización del medio por lo que no existen diferencias significativas ($P > 0.001$) entre los tipos de esterilización (anexo 3 y 4).

Se observa que el porcentaje de germinación más alto lo tiene el día de exposición a la fructosa de 30 días con un 73% para las semillas que permanecieron en un medio de cultivo esterilizado por filtración. El porcentaje de germinación más bajo fue para el tiempo de exposición a la fructosa de 109 con un 38% para las semillas que permanecieron en un medio de cultivo esterilizado por filtración.

En los tiempos de exposición a la fructosa de 30 y 109 podemos observar una diferencia entre los dos tipos de medio de cultivo de hasta un 30%, mientras que en los demás tiempos sólo existen diferencias de un 12%.

La gráfica 6 muestra un comportamiento similar en casi todos los tiempos de exposición a la fructosa ya que casi todos son estadísticamente iguales, siendo el día 30 de exposición al carbohidrato en un medio de cultivo esterilizado por filtración el único con diferencias significativas ($P < 0.001$) con respecto al medio de cultivo esterilizado por autoclave (anexo 3).

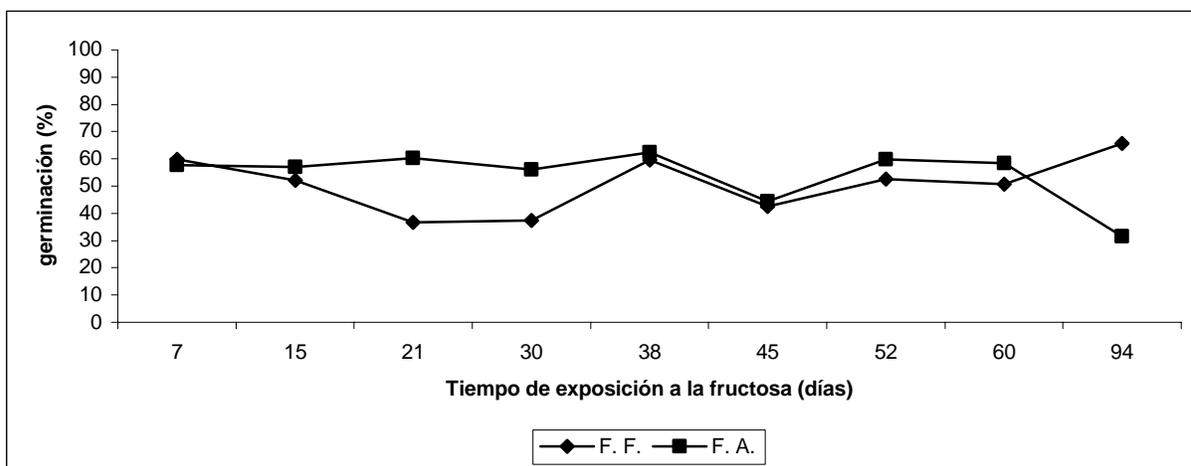


Gráfica 6. Germinación por el efecto del estímulo temporal de la fructosa en las semillas de *Laelia speciosa* expuestas inicialmente 45 días en MS-F. Nota: F = Fructosa.

Efecto del estímulo con fructosa en semillas de *Laelia speciosa* expuestas inicialmente 60 días sin F.

En la gráfica 7 aparentemente se ven favorecidas las semillas que estuvieron en un medio de cultivo esterilizado por filtración, pero el análisis estadístico indica que sólo existen diferencias en los tiempos 21 y 30 días de exposición a la fructosa con respecto a los dos tipos de medio de cultivo con diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los tipos de esterilización lo que indica que es mejor para esos tiempos el medio de cultivo esterilizado por autoclave (Anexo 4).

El porcentaje de germinación más alto en la gráfica 7 lo obtiene el día 94 con 65.74% para las semillas que permanecieron en un medio de cultivo esterilizado por filtración y el porcentaje más bajo lo obtiene el mismo tiempo de exposición pero para las semillas que estuvieron expuestas a un medio de cultivo esterilizado por autoclave con una diferencia entre uno y otro de 30%, aunque son estadísticamente iguales por que no existen diferencias significativas ($P > 0.001$) (Anexo 3 y 4).



Gráfica 7. Germinación por el efecto del estímulo temporal de la fructosa en las semillas de *Laelia speciosa* expuestas inicialmente 60 días en MS-F. Nota: F = Fructosa.

ÍNDICE DE DESARROLLO

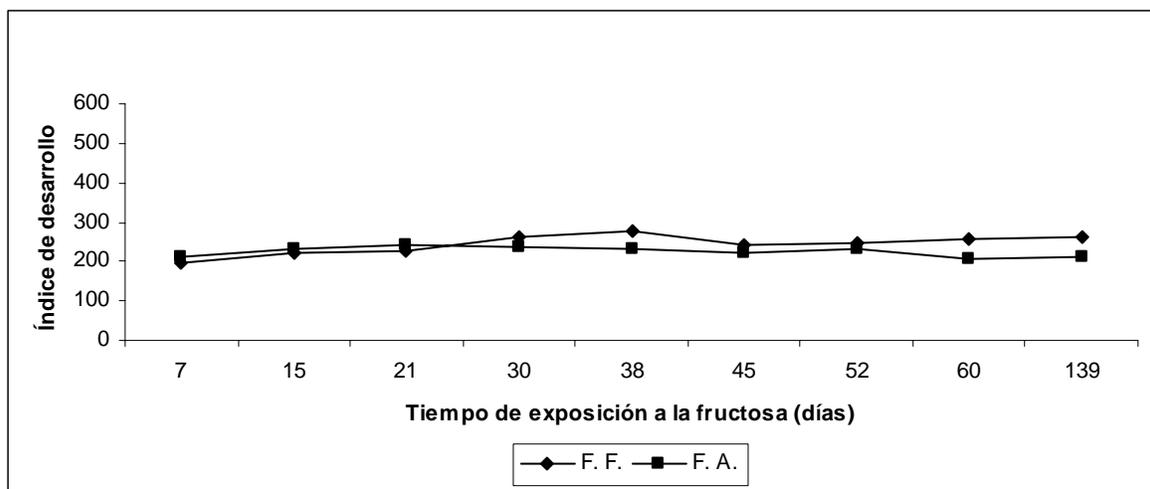
Efecto del estímulo con fructosa en semillas de *Laelia speciosa* expuestas inicialmente 15 días sin F.

Se observa en la gráfica 8 que el índice de desarrollo no llega a 300 para los diferentes tiempos de exposición a la fructosa con 15 días previos sin el estímulo, indicando que el total de semillas sólo alcanzaron el estadio dos de desarrollo (semilla hinchada), lo que es indicativo de que entre todos los tiempos de exposición a la fructosa no existen diferencias significativas ($P > 0.001$) por lo que son estadísticamente iguales (Anexo 5 y 6).

El más alto índice de desarrollo se encuentra en el tiempo de exposición a la fructosa de 38 días con 279 para las semillas que estuvieron en un medio de cultivo esterilizado por filtración, seguido por el tiempo 139 días con 214 de índice de desarrollo para el mismo tipo de esterilización (gráfica 8).

El mejor índice para las semillas que permanecieron en un medio de cultivo esterilizado por autoclave fue para el tiempo de 21 días de exposición al carbohidrato con 240.

Como se observa en la gráfica 8 el menor índice de desarrollo es para el tiempo de exposición a la fructosa 7 días en un medio de cultivo esterilizado por filtración en donde las semillas sólo alcanzan el estadio 1 de semilla sin germinar.

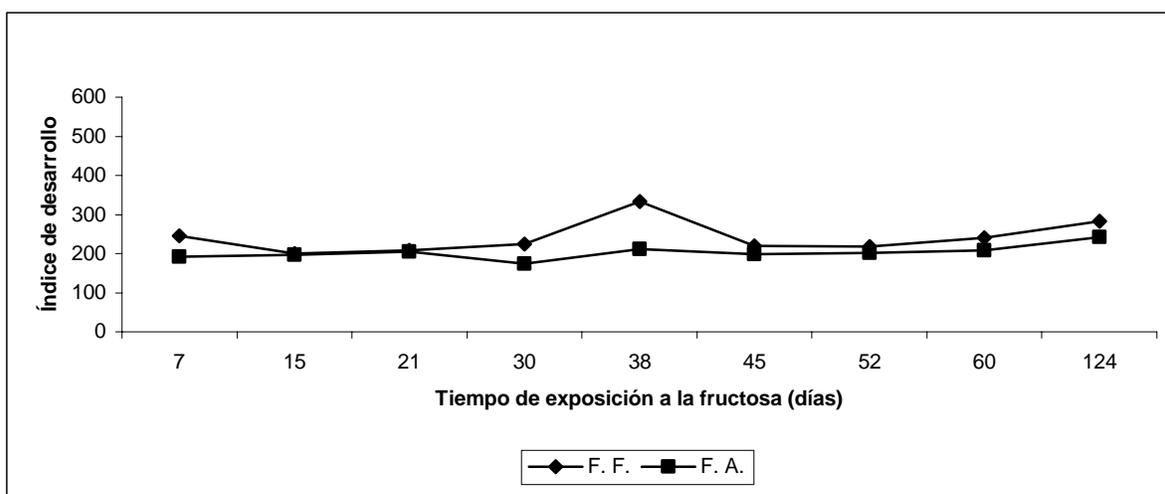


Gráfica 8. Desarrollo por el efecto del estímulo temporal de la fructosa en las semillas de *Laelia speciosa* expuestas inicialmente 15 días en MS-F. Nota: F = Fructosa.

Efecto del estímulo con fructosa en semillas de *Laelia speciosa* expuestas inicialmente 30 días sin F.

La gráfica 9 muestra que el día 38 de exposición a la fructosa esterilizada por filtración fue el único tiempo donde las semillas alcanzan el estadio 3 (protocormo) con un índice de desarrollo de 333, indicando que es el único estadísticamente diferente en el tiempo de exposición a la fructosa y en el tipo de esterilización (Anexo 5).

Los índices de desarrollo en la gráfica 9 alcanzados por todos los tiempos de exposición a la fructosa en un medio de cultivo esterilizado por filtración son el estadio 2 y 3 de desarrollo del embrión. No siendo así para el tipo de esterilización por autoclave en donde los tiempos 7, 15, 30 y 45 días se quedan en el estadio de desarrollo 1 de semilla sin germinar (gráfica 9). Aún con la existencia de estas variaciones en los resultados el análisis estadístico nos indica en general, que no existen diferencias significativas ($P > 0.001$) entre los tipos de esterilización del medio de cultivo así como entre los días de exposición a la fructosa por lo que son estadísticamente iguales.

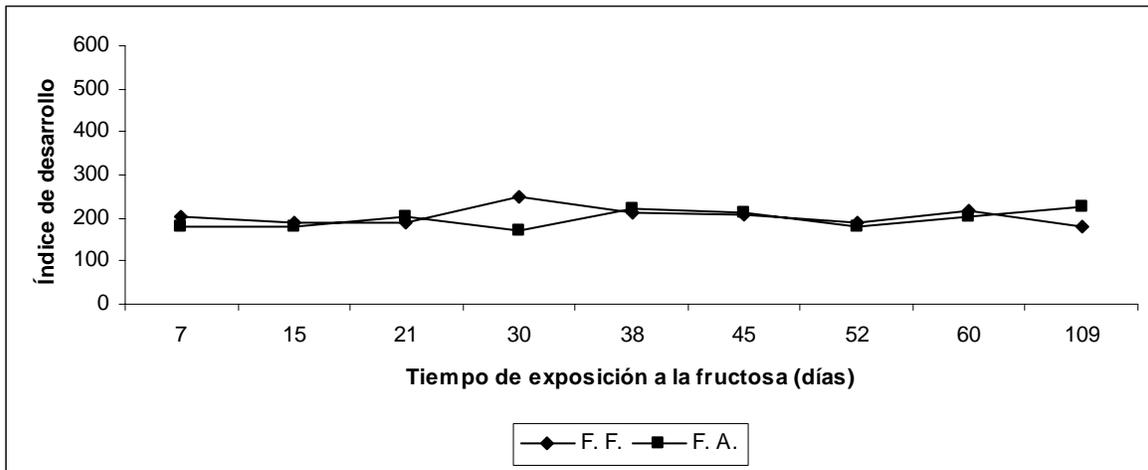


Gráfica 9. Desarrollo por el efecto del estímulo temporal de la fructosa en las semillas de *Laelia speciosa* expuestas inicialmente 30 días en MS-F. Nota: F = Fructosa.

Efecto del estímulo con fructosa en semillas de *Laelia speciosa* expuestas inicialmente 45 días sin F.

En el tiempo sin exposición a la fructosa de 45 días (gráfica 10) ningún tiempo de exposición a fructosa esterilizada por autoclave y por filtración rebasa el estadio 2 (semilla hinchada) lo que indica que no existen diferencias significativas ($P > 0.001$) entre los tipos de esterilización del medio de cultivo así como entre los días de exposición a la fructosa por lo que son estadísticamente iguales (Anexo 5y6).

El índice de desarrollo más alto en esta gráfica (10) es para el día 30 de exposición a la fructosa esterilizada por filtración que alcanza 248, lo que indica que las semillas alcanzaron el estadio de semilla hinchada o estadio 2 de desarrollo. Otros tiempos de exposición a la fructosa que alcanzan el estadio de semilla hinchada son 7, 38, 45 y 60 para la fructosa esterilizada por filtración y para la fructosa esterilizada en autoclave los tiempos de 21, 38, 45, 60 y 109. Los tiempos restantes para los dos tipos de esterilización permanecieron en estadio 1 o semilla sin germinar.

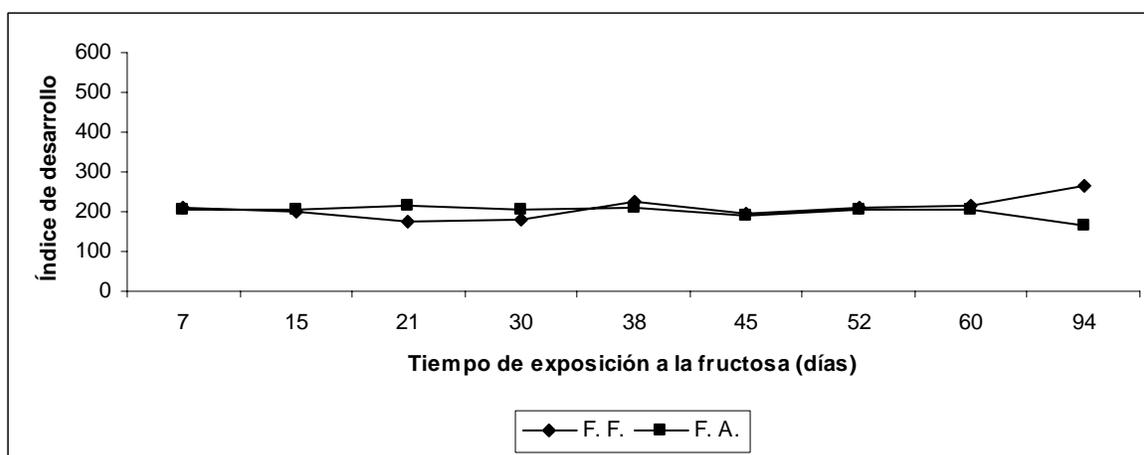


Gráfica 10. Desarrollo por el efecto del estímulo temporal de la fructosa en las semillas de *Laelia speciosa* expuestas inicialmente 45 días en MS-F. Nota: F = Fructosa.

Efecto del estímulo con fructosa en semillas de *Laelia speciosa* expuestas inicialmente 60 días sin F.

La gráfica 11 indica que no existen diferencias significativas ($P > 0.001$) (Anexo 5 y 6) entre los tipos de esterilización del medio de cultivo así como entre los días de exposición a la fructosa por lo que son estadísticamente iguales, como se puede observar los índices de desarrollo obtenidos para las semillas que permanecieron 60 días sin el estímulo de la fructosa alcanzan en sus diferentes tiempos de exposición al carbohidrato el estadio de semilla hinchada o estadio 2 de desarrollo del embrión.

Así mismo, los tiempos de exposición a la fructosa en sus dos tipos de esterilización permanecieron en el estadio 1 o de semilla sin germinar, como es el caso de los tiempos 21, 30 y 45 para las semillas que permanecieron en un medio de cultivo esterilizado por filtración, y los tiempos 45 y 94 para las semillas que permanecieron en un medio de cultivo con fructosa esterilizado por autoclave (gráfica 11).



Gráfica 11. Desarrollo por el efecto del estímulo temporal de la fructosa en las semillas de *Laelia speciosa* expuestas inicialmente 60 días en MS-F. Nota: F = Fructosa.

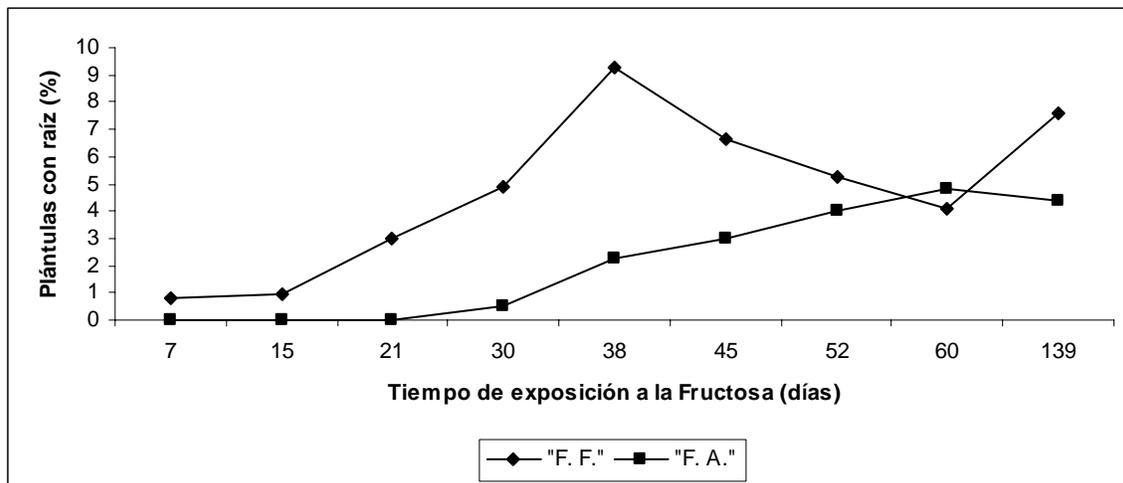
PLÁNTULAS CON RAÍZ VERDADERA

Efecto del estímulo con fructosa en semillas de *Laelia speciosa* expuestas inicialmente 15 días sin F.

En la gráfica 12 se observa que las semillas que permanecieron 15 días sin el estímulo de la fructosa en los diferentes tiempos de exposición a la misma, en un medio de cultivo esterilizado por filtración se desarrollaron plántulas en estadio 6 es decir plántulas completas con raíz en un rango que va desde 0.40 hasta 9.3 % aproximadamente.

El porcentaje más alto de plántulas en estadio 6 de desarrollo lo obtiene el tiempo 38 de exposición a la fructosa esterilizada por filtración con un 9.29 % y el porcentaje más bajo para este tipo de esterilización lo obtiene el día 7 con 0.47%.

En el caso de las semillas que permanecieron en un medio de cultivo adicionado con fructosa y esterilizado en autoclave los días 7, 15 y 21 no obtienen plántulas en estadio 6; obteniendo el porcentaje más alto en el día 60 de exposición con 4.8%.



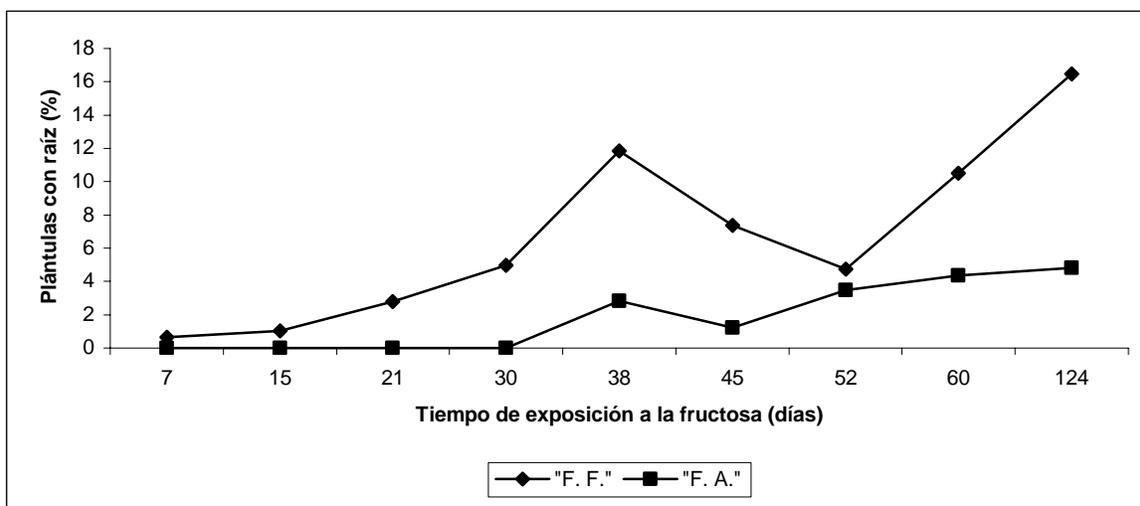
Gráfica 12. Porcentajes de plántulas con raíz verdadera por el efecto del estímulo temporal de la fructosa de las semillas de *Laelia speciosa* expuestas inicialmente 15 días en MS-F, a los 154 días de iniciada la siembra. Nota: F = Fructosa.

Efecto del estímulo con fructosa en semillas de *Laelia speciosa* expuestas inicialmente 30 días sin F.

La gráfica 13 muestra que las semillas que permanecieron 30 días sin el estímulo de la fructosa y diferentes tiempos con el estímulo del carbohidrato esterilizado por filtración desarrollaron plántulas completas con raíz (estadio 6).

Para las semillas que permanecieron 154 días en exposición a la fructosa esterilizada por filtración su porcentaje fue el más alto de todos los tratamientos con 16.46%; seguido del tiempo 38 de exposición para el mismo tipo de esterilización con 11.86%.

En las semillas que permanecieron en tratamientos con diferentes tiempos de exposición a la fructosa en un medio de cultivo esterilizado por autoclave los días 7, 15, 21 y 30 días no desarrollaron plántulas completas o en estadio 6. El porcentaje más alto para este tipo de esterilización se obtuvo al exponerlas 154 días a la fructosa con 4.83% (gráfica 13).



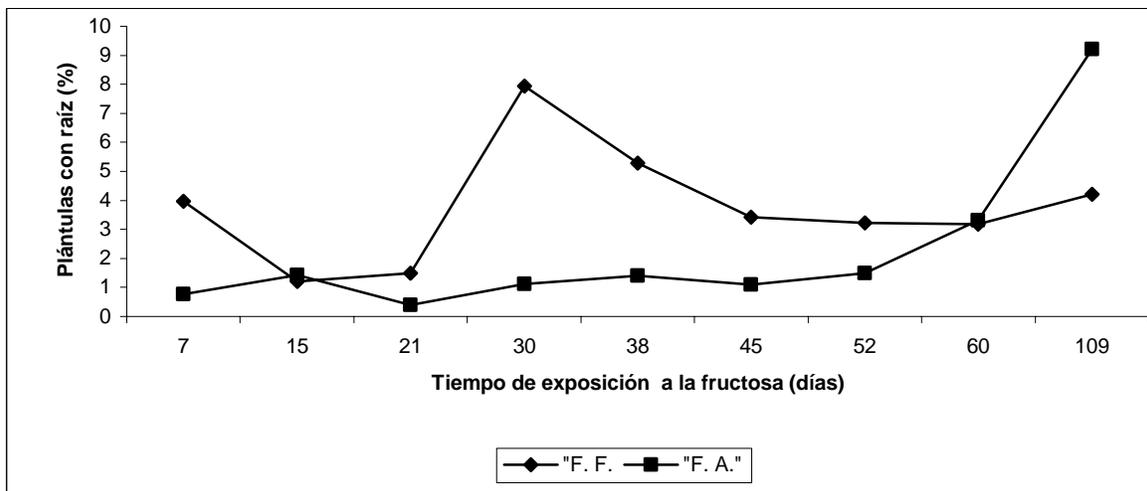
Gráfica 13. Porcentajes de plántulas con raíz verdadera por el efecto del estímulo temporal de la fructosa de las semillas de *Laelia speciosa* expuestas inicialmente 30 días en MS-F, a los 154 días de iniciada la siembra. Nota: F = Fructosa.

Efecto del estímulo con fructosa en semillas de *Laelia speciosa* expuestas inicialmente 45 días sin F.

En las semillas que permanecieron 45 días sin el estímulo de la fructosa (gráfica 14) y 154 días en un medio adicionado con fructosa esterilizado por autoclave obtuvo el porcentaje de plántulas en estadio 6 más alto con 9.2%.y el más bajo para este tipo de esterilización fue para el día 21 de exposición la fructosa de 0.4%.

Para el tipo de esterilización por filtración el porcentaje más alto fue para 30 días de exposición a la fructosa de 7.94% y el más bajo para el tiempo de exposición de 15 días con 1.2%.

En este tiempo de 45 días sin el estímulo de la fructosa (gráfica 14) se observa que todos los tiempos de exposición a la fructosa en los diferentes tipos de esterilización desarrollaron plántulas completas con una raíz.

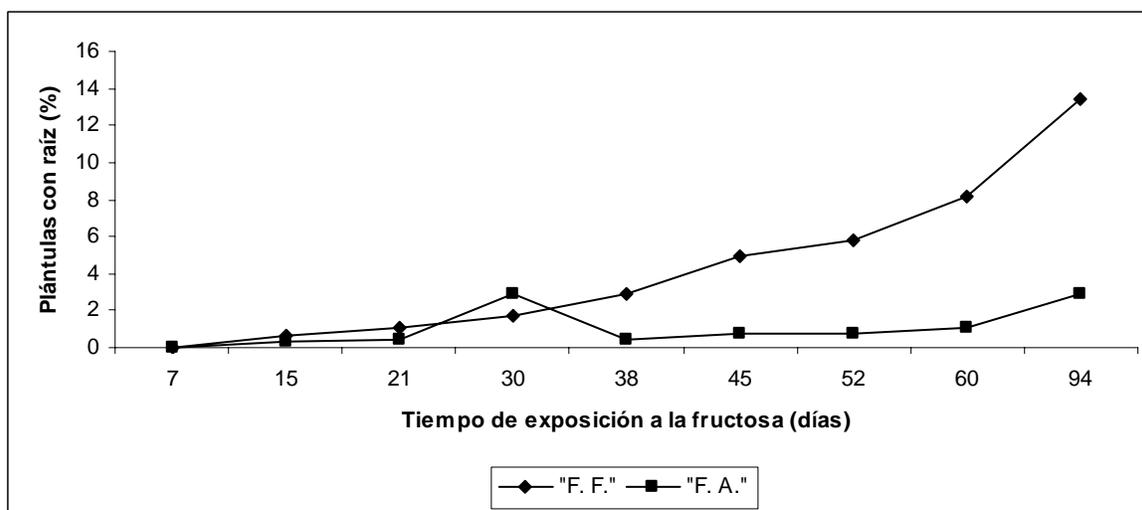


Gráfica 14. Porcentajes de plántulas con raíz verdadera por el efecto del estímulo temporal de la fructosa de las semillas de *Laelia speciosa* expuestas inicialmente 45 días en MS-F, a los 154 días de iniciada la siembra. Nota: F = Fructosa.

Efecto del estímulo con fructosa en semillas de *Laelia speciosa* expuestas inicialmente 60 días sin F.

En la gráfica 15 se observa que las semillas que permanecieron en un medio de cultivo adicionado con fructosa en el día 7 no se diferenciaron en plántulas en estadio 6 para los diferentes tipos de esterilización.

En el día 154 de exposición a la fructosa se obtiene el porcentaje más alto para los dos tipos de esterilización, siendo de 13.42 para el medio de cultivo esterilizado por filtración y de 2.95 para el medio de cultivo esterilizado por autoclave, resultando estadísticamente diferentes.



Gráfica 15. Porcentajes de plántulas con raíz verdadera por el efecto del estímulo temporal de la fructosa de las semillas de *Laelia speciosa* expuestas inicialmente 60 días en MS-F, a los 154 días de iniciada la siembra. Nota: F = Fructosa.

DISCUSIÓN

VIABILIDAD

La prueba de viabilidad con tetrazolio permitió determinar la condición fisiológica de los embriones de las semillas de *Laelia speciosa* de los cuatro frutos, ya que debido a las características y a las condiciones de cada fruto puede haber variaciones en la viabilidad de éstos (Shoushtari *et al.*, 1994; Miyoshi y Mii, 1995; Ortiz, 2001).

La prueba de viabilidad con tetrazolio se basa en la respiración de las semillas, las semillas viables al momento de respirar liberan enzimas dehidrogenasas, el hidrógeno liberado por la reacción de la dehidrogenasa en los tejidos vivos se combina con la sal de tetrazolio que es incolora para formar un pigmento rojo (formazán) tiñendo a los embriones vivos de las semillas de *Laelia speciosa*. Es claro que los embriones no coloreados indican poca actividad de las células embrionarias o muerte (Moreno 1984; Ortiz, 2001).

Las tablas de tolerancia máxima certifican, de acuerdo con las tablas citadas por Moreno (1984), los resultados obtenidos en las pruebas de viabilidad, además, valida la relación entre los porcentajes de viabilidad y los porcentajes de germinación, que están estrechamente ligados.

GERMINACIÓN

Para el presente estudio se tomó como criterio de germinación cuando el embrión se hinchó y rompió la testa sin importar si presentaba coloración verde o no, de acuerdo con Arditti, (1966); Arditti, (1967); Harrison y Arditti, (1978); Betchel *et al.*, (1986); Baker *et al.*, (1987), Smreciu y Currah, (1989); St-Arnaud *et al.*, (1992).

En las gráficas 1, 2 y 3 los resultados indican que el estímulo de un carbohidrato, en este caso fructosa, no es fundamental para iniciar el proceso de germinación (Harrison y

Arditti, 1978; Ernst *et al.*, 1984; Leroux *et al.*, 1995; Neyra y Rosas, 1998); se puede inferir que es indistinto el hecho de que haya carbohidrato o no para que se dispare el proceso de germinación ya que éste proceso inició a los siete días (gráficas 1, 2 y 3) lo que concuerda con lo reportado por Neyra y Rosas (1998) también para *Laelia speciosa* pero con la diferencia de que en su caso las semillas inician en un medio de cultivo adicionado con fructosa. Este resultado es muy similar a lo reportado por Harrison y Arditti, (1978) para el género *Cattleya* (género muy cercano a *Laelia*) en el cual el proceso de germinación *in vitro* inicia a los ocho días en un medio adicionado con sacarosa y a los 12 días en un medio sin el estímulo de algún carbohidrato, lo que es indicativo de que las semillas sólo necesitan humedad para iniciar dicho proceso.

La gráfica 3 muestra que el proceso de germinación fue favorecido cuando las semillas permanecieron en un medio de cultivo esterilizado por filtración, mostrando una diferencia con lo reportado para *Laelia speciosa* por Neyra y Rosas (1998) en donde el tipo de esterilización de la fructosa no afecta la germinación de las semillas ya que ellas reportan porcentajes similares en ambos tipos de esterilización.

Los resultados de las gráficas 5, 6 y 7 muestran muy pocas variaciones entre los tiempos de exposición a la fructosa, el tiempo de espera para recibir el estímulo y el tipo de esterilización de la fructosa en el medio de cultivo, los porcentajes de éstas gráficas fluctúan entre el 45 y 70% y en la gráfica 4 los porcentajes van desde el 50 hasta el 80%. Estos resultados concuerdan con lo establecido por Moreno (1984) en la similitud del porcentaje de viabilidad de las semillas con el porcentaje de germinación; aún así, esto no es indicativo de que el total de las semillas se desarrollen hasta plántulas completas a los 154 días de iniciada la siembra.

Estos resultados de la germinación pueden causar un poco de confusión si se comparan con el índice de desarrollo y con el porcentaje de plántulas completas, por lo que es importante recordar, que el proceso de germinación inicia cuando la semilla se hincha, no importando si después continúa o no su desarrollo morfogénico (Harrison y Arditti, 1978)

Si comparamos el comportamiento de las semillas de *Laelia speciosa* de este estudio con el obtenido por Neyra y Rosas (1998), se observa que el porcentaje de germinación más alto en su trabajo fue del 100%, mientras que en este estudio fue del 82%, lo que indica que

no hay grandes variaciones entre los porcentajes, por lo tanto el estímulo de la fructosa al inicio de la germinación *in vitro* no es fundamental para que el total de las semillas germinen.

No existe comparación alguna entre la germinación *in vitro* y la germinación en condiciones naturales, ya que en condiciones naturales sólo germinan una en 5 000 a una en 20 000 semillas, dependiendo del sitio (Hágsater *et al* 2005), por lo que se puede decir que en la germinación *in vitro* existe una mayor ventaja en la germinación, ya que todos los factores ambientales que inciden en la germinación *ex vitro*, se pueden controlar en el laboratorio, debido a esto es importante que todos los estudios sobre las orquídeas tengan como meta la conservación de éstas en condiciones naturales.

ÍNDICE DE DESARROLLO

La fructosa es una fuente de carbono y energía para el embrión, siendo el estímulo disparador para su desarrollo morfogénico durante su germinación (Luna y Barba, 1993) debido a que las semillas de orquídea germinan más rápido en carbohidratos simples como lo es la fructosa (Arditti, 1972), aunque Harrison y Arditti (1978) reportan que la aparición de hojas en las plántulas es más lento con fructosa en comparación con sacarosa.

Como se evidencia (gráficas 8-11), las semillas expuestas a un medio de cultivo sin importar el tipo de esterilización no sobrepasa el índice de desarrollo de 300 a los 154 días de iniciada la siembra aun con lo reportado por Harrison (1977), Harrison y Arditti (1978) y Ernst y Rodríguez (1984) donde mencionan que las semillas de *Cattleya aurantiaca* que han alcanzado el índice de desarrollo de 200 requieren de 30 días para alcanzar el índice de 300 o estadio de protocormo, de 40 a 47 días para que aparezca la primera hoja y de 60 a 90 días para que aparezca la segunda hoja en un medio de cultivo adicionado con sacarosa.

Si se toma en cuenta que *Cattleya* es uno de los géneros más cercanos a *Laelia speciosa* se esperaría un comportamiento parecido, pero no fue así y eso concuerda con lo reportado por Arditti *et al* (1982), que mencionan, que las necesidades de un carbohidrato

para la germinación van a variar entre especies y entre géneros que pertenecen a la misma familia.

También se observó que las semillas que no reciben el estímulo de la fructosa y ya han alcanzado el estadio de protocormo, permanecen en ese estadio deteniendo el desarrollo morfogénico hasta que reciben el estímulo en este caso de la fructosa, lo que nos indica que este carbohidrato es un estimulante importante para la formación de hojas y raíces. (Harrison, 1977; Harrison y Arditti, 1978; Ernst y Rodríguez, 1984; Leroux et al, 1995).

Lo que muestra la gráfica 8 concuerda con lo reportado por Harrison (1977), Harrison y Arditti (1978) y Ernst y Rodríguez (1984) para *Cattleya aurantiaca* en donde las semillas alcanzaron aproximadamente un índice de desarrollo de 200 después de 12 días de iniciada la siembra en un medio de cultivo sin sacarosa.

Los índices de desarrollo de los embriones (gráfica 9) para el tiempo 30 sin exposición a la fructosa casi en su mayoría no rebasaron el estadio 2 de semilla hinchada o índice de desarrollo 200, sólo el tiempo 38 días de exposición coincide con lo reportado por Harrison & Arditti (1978) para *Cattleya aurantiaca* que aproximadamente a los 30 días de iniciada la siembra en un medio de cultivo sin sacarosa los embriones alcanzan un índice de desarrollo de 300 o estadio de protocormo.

En la grafica 10, los embriones que permanecieron 45 días sin el estímulo de la fructosa y los respectivos tiempos en ella, sus resultados no coinciden con lo que Harrison & Arditti (1978) y Ernst & Rodríguez (1984) reportan para *Cattleya aurantiaca*, que aproximadamente a los 30 días de iniciada la siembra en un medio de cultivo sin sacarosa los embriones alcanzan un índice de desarrollo de 300 o estadio de protocormo.

Los resultados indican que aproximadamente el 90 % de los embriones se quedaron en un índice de desarrollo de semilla hinchada, es decir que no formaron al final de estudio plantas completas; también muestran, que las variables utilizadas (tiempo sin exposición de la fructosa, exposición temporal a la misma y tipo de esterilización del medio) afectaron directamente al desarrollo del embrión, ya que al comparar estos resultados con los obtenidos por Neyra y Rosas (1998) en semillas expuestas 38 días o más a la fructosa desde un inicio a los 98 días de iniciada la siembra, entre el 68 y 73% de éstas se desarrollaron a plántulas.

Los resultados indican, que el tipo de esterilización de la fructosa no fue determinante para disparar el desarrollo del embrión ya que se obtuvieron resultados similares en el medio esterilizado por filtración y en el medio esterilizado por autoclave, sin embargo los mejores índices (333 y 279), es decir los más altos fueron los que estuvieron expuestos a un medio de cultivo con fructosa esterilizada por filtración, siendo un resultado similar a lo obtenido por Neyra y Rosas (1998).

El tiempo de exposición a la fructosa no fue determinante en el desarrollo del embrión, ya que no afecta el tiempo que permanezcan las semillas en el medio con el estímulo de la fructosa, éstos se desarrollaron de manera similar y alcanzan índices similares.

Los índices de desarrollo obtenidos muestran que el efecto de la espera de la fructosa al inicio de la germinación puede ser un factor sumamente importante en la germinación de semillas de *Laelia speciosa* en condiciones naturales, de ahí la importancia de los resultados obtenidos, dado que se puede extrapolar lo se obtuvo en este estudio con lo que sucede en la naturaleza; suponiendo que si el hongo, que en este caso le proporciona fructosa a la semilla no llega a tiempo, es decir, al inicio de la germinación, el tiempo de espera del protocormo influye en la cantidad de plantas que se puedan obtener en un tiempo futuro determinado, y esto impactará notablemente en el tamaño y la permanencia de la población.

PLÁNTULAS CON RAÍZ VERDADERA

Los resultados obtenidos en este estudio (Gráficas 8-11) no concuerdan con algunos de los resultados reportados por Harrison y Arditti (1978), que indican que las semillas de *Cattleya aurantiaca* después de haber estado en un medio sin el estímulo de la sacarosa por 15, 30, 60 días, requieren de 21-30 días con el estímulo de sacarosa para que el 50% de los protocormos se desarrollen en plántulas completas o con un índice de desarrollo de 600, ya que aun cuando las semillas de *Laelia speciosa* permanecieron más de 60 días con el

estímulo de la fructosa ya sea esterilizada por autoclave o por filtración aproximadamente entre el 0.5 y el 16 % alcanzaron el estadio 6, como se muestra en las gráficas 12-15.

Se observó que las semillas de *Laelia speciosa* para su germinación no necesitan por tiempo indefinido el estímulo de la fructosa, contrario a lo que reportan Harrison (1977), Harrison y Arditti (1978) y Arditti *et al* (1990) con *Cattleya aurantiaca* que necesita alrededor de 40 días con una fuente exógena de carbohidrato para volverse autótrofas. Las semillas de *Laelia speciosa* aún cuando permanecieron 15, 30, 45 o 60 días sin el estímulo de ésta necesitaron sólo siete días con el estímulo en un medio esterilizado por filtración o por autoclave para desarrollar un pequeño pero significativo porcentaje entre el 0.4% y 16.46% de plántulas completas con una raíz o en estadio 6.

Leroux *et al.*, 1995 muestran que los protocormos de *Cypripedium acaule* al no tener el estímulo de un carbohidrato degeneran. Ernst y Rodríguez (1984) indican que los protocormos de *Orchis purpurela* al no recibir una fuente exógena de carbohidrato, el desarrollo de éstos cesa después de tres meses, contrario a lo que ocurre con *Laelia speciosa*, ya que al permanecer sus protocormos sin el estímulo de fructosa aproximadamente dos meses podemos inferir que más del 50% de los protocormos detuvieron su desarrollo antes de los dos meses y fueron incapaces de metabolizar la fructosa cuando le fue suministrada, aún cuando las condiciones para la germinación fueron las óptimas, con estos resultados podemos decir que el impacto de una larga espera de un hongo que le proporcione fructosa en condiciones naturales puede ser negativo para las semillas de *Laelia speciosa*, aún una pequeña espera influye en el desarrollo morfogénico del embrión y esto se ve reflejado en la obtención de plántulas completas en condiciones naturales, que oscila entre el 68% y el 88% de las semillas germinadas que alcanzan el estadio de plántulas completas y sobreviven hasta llegar a la etapa reproductiva (Hágsater *et al.*, 2005).

Se puede observar (gráficas 11-15) que en el medio de cultivo esterilizado por filtración se obtienen los resultados de porcentajes de plántulas con raíz verdadera más altos en comparación con el tipo de esterilización por autoclave

Neyra y Rosas (1998) reportan que las semillas de *Laelia speciosa* que permanecieron sobre fructosa esterilizada por autoclave no culminaron el proceso de germinación es decir no obtuvieron plántulas completas o en estadio 6, reportando así una

gran diferencia con los resultados obtenidos en este estudio ya que como se puede observar en las gráficas 12-15 que hay porcentajes desde 0.5 hasta 16% de semillas que llegan al estadio 6 y que permanecieron en un medio de cultivo adicionado con fructosa esterilizado por autoclave. Esta diferencia podría estar relacionada con la variabilidad genética de las semillas ya que estas provienen de una población natural y por lo tanto los individuos pueden expresar respuestas distintas a condiciones adversas ya sea en su medio ambiente natural o en condiciones de laboratorio, por lo que nos plantea una incógnita, ya que la fructosa esterilizada por autoclave lleva a cabo un proceso de descomposición (103-105°C) (Hawley, 1975), debido a que el autoclave alcanza una temperatura de 121°C, entonces, ¿qué es y cómo utilizan los embriones de *Lelia speciosa* el producto de la descomposición de la fructosa?

CONCLUSIONES

La germinación es favorecida por el tipo de esterilización por filtración.

El tiempo de cultivo de las semillas de *Laelia speciosa* sin el estímulo de la fructosa, así como el tiempo de exposición a ésta, no afectan a la germinación.

La fructosa como fuente exógena de carbono y de energía induce el desarrollo morfológico del embrión en las semillas de *Laelia speciosa* y sustituye al hongo simbionte específico bajo condiciones *in vitro*.

No fue evidente un tiempo mínimo requerido del estímulo con fructosa en las semillas de *Laelia speciosa* para inducir el desarrollo embrionario y producir plántulas completas.

Al no tener los embriones de *Laelia speciosa* en el medio de cultivo una fuente de carbono y energía como la fructosa, detienen su desarrollo morfogénico en el estadio 3 o de protocormo y posteriormente mueren.

Los embriones de *Laelia speciosa* al no tener una fuente de fructosa al inicio de la germinación, no alcanzan la mitad de ellos la forma de plántulas completas.

El tiempo sin presencia de la fructosa al inicio de la germinación influye en el desarrollo del embrión así como en su desarrollo hasta plántula completa.

El tiempo de exposición a la fructosa fue desfavorable para el desarrollo de los embriones que permanecieron en un inicio sin este estímulo.

El medio de cultivo adicionado con fructosa esterilizado por filtración induce una mayor cantidad de plántulas completas.

BIBLIOGRAFÍA

Abraham & Vatsala, 1981. Introduction to orchids with illustrations of 159 South Indian Orchids. Tropical Botanic Garden & Research Institute Trivandrum. India. 32, 55, 56, 134 pp.

Arditti, J. 1966. Orchids. Scientific American. 204(1). 70-78 pp.

Arditti, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. The botanical review. 33(1): 1-83.

_____, P.L. Healey & R. Ernst. 1972. The role of mycorrhiza in nutrient uptake of Orchids II: extra cellular hydrolysis of oligosaccharides by asymbiotic seedlings. Amer. Orch. Soc.Bull. 41:503-510.

_____, & R. Ernst. 1984. Physiology of germinating orchid seeds. In Orchid Biology III. J.Arditti (ed). Comstock Publishing Associates. U.S.A.: 177-222.

_____, R. Ernst, T. W. Yam & C. Glabe. 1990. The contributions of orchid mycorrhizal fungi to seed germination: a speculative review. Lindleyana, 5(4):249-255.

_____, J. 1992. Fundamentals of Orchid Biology. John Wiley & sons, Inc. USA. 691 pp.

Ávila, I. y K. Oyama. 2002. Manejo sustentable de *Laelia speciosa* (Orchidaceae).Biodiversitas. No. 43:9-12.

Baker, M. K., M. C. Mathes & B. J. Wallace. 1987. Germination of *Pontieva* and *Cattleya* seeds and development of *Phaleonopsis* protocorms. Lindleyana. 2(2): 77-83.

Betchel, H., P. Cribb & E. Launert. 1986. The manual of cultivated orchid species. The MIT Press. Cambridge, Massachussets. 444 pp.

- Buentello, V. B., H. Rosas y S. Luna. 1997. Efecto de la exposición limitada de fructosa y sacarosa al inicio de la germinación de semillas de *Laelia speciosa*. Memorias del VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y II Simposio Internacional Sobre Ingeniería de Bioprocesos. Mazatlán, México.
- Caneva, S. 1978. Orquídeas: principales géneros y especies, su cultivo. Albatros. Argentina. 230 pp.
- Clements, M. A. 1988. Orchid mycorrhizal associations. *Lindleyana* 3(2): 73-86.
- Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press. New York. 1262 pp.
- Del Castillo, M. & D. J. Ackerman. 1992. The orchids of Puerto Rico and the Virgin Islands. Editorial de la Universidad de Puerto Rico. 167 pp.
- Dressler, R. L. 1981. The Orchids: natural history and classification. Harvard University Press. Cambridge, USA. 332 pp.
- Eccardi, F. y R. Becerra. 2003. Las orquídeas en CITES. Entrevista a Eric Hagsater. *Biodiversitas*, No.49.
- _____. 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. Dioscorides Press. Portland Oregon. 314 pp.
- Ernst, R. 1967. Effect of carbohydrate selection on the growth rate of freshly germinated *Phaleonopsis* and *Dendrobium* seed. *American Orchid Society Bulletin*, 36: 1068-1073.

- _____, R., J. Arditti & P. L. Healey. 1971. Carbohydrate physiology of orchid seedlings II. Hydrolysis and effects of oligosaccharides. *American Journal of Botany*, 58(9): 827-835 pp.
- _____, & E. Rodríguez. 1984. Carbohydrates of the Orchidaceae in *Orchid Biology. Reviews and Perspectives*. III. J., Arditti (ed.). Comstock Publishing Associates. USA. 223-260 pp.
- Goh, C. J., Markovina, A. L. & P. A. McGee. 2000. Comparison of symbiotic and asimbiotic seed germination and plantlet development in *Sarcochilus* (Vandae; Orchidaceae). *Lindleyana*, 15(2):68-72.
- Goh, C. J. 1992. Mycorrhizal associations in some tropical orchids. *Lindleyana* 7(1): 13-17.
- Hágsater, E., M.Á. Soto Arenas, G.A. Salazar Chávez, R. Jiménez Machorro, M.A. López Rosas y R.L. Dressler. 2005. *Las orquídeas de México*. Instituto Chinoín, México, 304 pp.
- Halbinger, F. 1993. *Laelias de México*. Asociación Mexicana de Orquideología, A. C. México. 62-68 pp.
- _____ & M.A. Soto. 1997. *Laelias of Mexico*. *Orquídea (Mex)*. 15:135-139 p.
- Harrison, M. J. 1999. Molecular and cellular aspects of the arbuscular micorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:361-389.
- Harrison, C. R. 1977. Ultrastructural and histochemical changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). *Botanical Gazette*, 138(1): 41-45.
- _____, & J. Arditti. 1978. Physiological changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). *Botanical Gazette* 139(2): 180-189.

- Hawley, G.G. 1975. Diccionario de química y de productos químicos. Traducción al español de Luis García Ramos. Ediciones Omega. Barcelona, España. 418-419 pp.
- Leroux, G., D. Berabé y J. Vieth. 1995. Morphogenèse comparée de protocormes du *Cypripedium acaule* (Orchidaceae) Cultivés in vitro avec ou sans sucre. Canadian Journal of Botany, 73: 1391-1406 pp.
- Luna, R. B. y A. Barba. 1993. Estudio morfogénico de la semilla de *Laelia speciosa* (H.B.K.) SCHLTR durante su germinación asimbiótica *in vitro*. In V encuentro Latinoamericano de Orquideología. Octubre, 19-25; 24-25 pp.
- Markovina, A-L & P. A. McGee. 2000. Comparison of symbiotic seed germination and plantlet development in *Sarcochilus* (Vandae; Orchidaceae). Lindleyana 15(2): 68-72 pp.
- Miyoshi, K, M. Mii. 1995. Phytohormone pre-treatment for the enhancement of seed germination and protocorm formation by terrestrial orchid, *Calanthe discolor* (Orchidaceae) in symbiotic culture. Scientia Horticulturae, 63: 263-267 pp.
- Moreno, M. E. 1984. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Instituto de Biología. UNAM. México.
- Neyra, M. C. y H. Rosas. 1998. Efecto del estímulo por fructosa y glucosa al inicio de la germinación de semillas de *Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr. Tesis de licenciatura. UNAM. FES-ZARAGOZA. México. 43 pp.
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL. Publicada el 6 de marzo del 2002.
- Ortiz, M. V. 2001. Viabilidad de las semillas de 3 especies de orquídeas del Valle de Tehuacan, Puebla, bajo condiciones de almacenamiento. Tesis de licenciatura. UNAM. FES-IZTACALA. México.

-
- Peterson, R. L. & R. S. Currah. 1990. Synthesis of mycorrhizae between protocorms of *Goodyera repens* (Orchidaceae) and *Ceratobasidium cereale*. Canadian Journal of Botany, Vol.68: 117-1125
- Richardson, K.A., R.L. Peterson, & R. S. Currah. 1992. Seed reserves and early symbiotic protocorm development of *Platanthera hyperborean* (Orchidaceae). Canadian Journal of Botany, 70: 291-300.
- Shoustari, B. D., R. Heydari, G. L. Johnson & J. Arditti. 1994. Germination and viability staining of orchid seeds following prolonged storage. Lindleyana 9(2): 77-84.
- Smreciu, E. A. & R. S. Currah. 1989. Symbiotic germination of seeds of terrestrial orchids of North America and Europe. Lindleyana, 4(1): 6-15.
- Soto, M. A. y E. Hágater. 1990. Algunas ideas acerca de la conservación de las orquídeas mexicanas y un listado terminal de los taxos amenazados. pp. 155-172. en áreas naturales protegidas en México y especies en extinción. J. L. Camarillo y Rivera, F. (Eds) UNAM.
- Soto- Arenas, M. A. 1996. México (regional account). pp 53-58. En IUCN/SSC°. Orchid specialist group. Orchids. Status survey and conservation action plan, UICN.
- St-Arnaud, M. D., Lauzer & D. Berabé. 1992. In vitro germination and early growth of seedlings of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). Lyndleyana 7(1): 22-27.
- Stancato, G. C., E. P. Chagas & P. Mazzafera. 1998. Development and germination of seeds of *Laelia purpurata* (Orchidaceae). Lindleyana 13(2): 97-100.

- Stancato, G. C. & R. T. Faria. 1996. In vitro grow and mineral nutrition of the lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* Batem. (Orchidaceae) I: effects of macro and microelements. *Lindleyana* 11(1): 41-43.
- Tomita, M. & M. Tomita. 1997. Effects of culture media and cold treatment on germination in asimbiotic culture of *Cypripedium macranthos* and *Cypripedium japonicum*. *Lyndleyana* 12(4):208-213.
- Tsutsuit, K. & M. Tomita. 1990. Suitability of several carbohydrates as the carbon sources for symbiotic seedling growth of two orchid species. *Lindleyana*, 5(2): 134-139.
- Velázquez, V. R. 1997. Efecto de sacarosa, glucosa y fructosa sobre la germinación de las semillas, el desarrollo y crecimiento de plántulas de *Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr. Cultivadas in vitro. Tesis de licenciatura. UNAM. FES-ZARAGOZA. México. 62 pp.
- Vujanovic, V. St-Arnaud, M. Berabé & D. Thibeautl, G. 2000. Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. *Anal. Bot.* 86:79-86.
- Wiard, L. A. 1987. An introduction to the orchids of Mexico. Comstock Publishing Associates. USA. 239 pp.
- Withner, C. L. 1988. The orchids: a scientific survey. Robert E. Krieger Publishing Company. U.S.A.

Anexo 1

Para observación 7 días

Comparación de medias de Duncan para el Porcentaje de Germinación de Semillas de *Laelia speciosa* esterilizadas por filtración

	Variable de estudio: Índice de desarrollo								
Tratamientos	15/7	15/15	15/21	15/30	15/38	15/45	15/52	15/60	15/139
Media ± DS	20.8 ± 5.9 AB	63.6 ± 15.4 ST	48.5 ± 31.3 UV	53.2 ± 25.7 UV	68.4 ± 22.2 ST	46.4 ± 26.0 UV	51.5 ± 32.2 UV	47.9 ± 35.9 UV	82.4 ± 13.0 RS
C.V.	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9
Varianza	35.0	239.7	980.3	662.1	495.9	680.7	1036.9	1289.1	169.5
Significativo al	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

15/7; donde el primer número indica tiempo sin exposición al CH y el segundo indica tiempo de exposición al CH, Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)

	Variable de estudio: Índice de desarrollo								
Tratamientos	30/7	30/15	30/21	30/30	30/38	30/45	30/52	30/60	30/124
Media ± DS	77.2 ± 7.3 ST	34.9 ± 6.0 AB	29.2 ± 30.1 AB	15.5 ± 8.4 AB	26.5 ± 9.7 AB	30.5 ± 10.2 AB	33.4 ± 9.3 AB	36.6 ± 10.0 UA	63.9 ± 9.6 ST
C.V.	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9
Varianza	54.2	36.1	1447.2	71.5	94.7	104.6	87.1	100.1	74.0
Significativo al	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

30/7; donde el primer número indica tiempo sin exposición al CH y el segundo indica tiempo de exposición al CH, Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)

	Variable de estudio: Índice de desarrollo								
Tratamientos	45/7	45/15	45/21	45/30	45/38	45/45	45/52	45/60	45/109
Media ± DS	9.2 ± 7.0 DE	2.5 ± 2.5 FG	1.0 ± 1.7 G	3.7 ± 1.2 FG	4.6 ± 5.7 FG	10.2 ± 11.4 DE	4.0 ± 1.9 FG	14.5 ± 8.4 AB	1.5 ± 1.6 G
C.V.	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9
Varianza	49.2	6.5	3.0	1.6	32.7	131.6	3.9	71.7	2.7
Significativo al	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

45/7; donde el primer número indica tiempo sin exposición al CH y el segundo indica tiempo de exposición al CH, Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)

	Variable de estudio: Índice de desarrollo								
Tratamientos	60/7	60/15	60/21	60/30	60/38	60/45	60/52	60/60	60/94
Media ± DS	1.5 ± 0.8 G	2.4 ± 3.5 FG	1.0 ± 0.9 G	0.2 ± 0.6 G	6.4 ± 4.2 EF	7.0 ± 14.7 EF	06 ± 0.6 G	0.5 ± 1.1 G	1.8 ± 3.0 FG
C.V.	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9
Varianza	0.8	12.3	0.9	0.4	18.1	216.3	0.9	0.3	9.5
Significativo al	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

60/7; donde el primer número indica tiempo sin exposición al CH y el segundo indica tiempo de exposición al CH, Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)

Anexo 2

Para observación 14 días

Comparación de medias de Duncan para Porcentaje de Germinación de Semillas de *Laelia speciosa* esterilizadas por filtración

	Variable de estudio: Índice de desarrollo								
Tratamientos	15/7	15/15	15/21	15/30	15/38	15/45	15/52	15/60	15/139
Media \pm DS	39.5 \pm 25.9E	70.1 \pm 14.2 EF	58.9 \pm 31.0 FG	59.3 \pm 23.7 FG	75.7 \pm 16.5 EF	57.0 \pm 17.8 FG	59.6 \pm 29.0 FG	57.7 \pm 31.3 FG	66.3 \pm 12.2 FG
C.V.	52.5	52.5	52.5	52.5	52.5	52.5	52.5	52.5	52.5
Varianza	675.5	202.0	961.9	564.3	275.2	318.6	844.4	981.4	149.7
Significativo al	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

15/7; donde el primer número indica tiempo sin exposición al CH y el segundo indica tiempo de exposición al CH, Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)

	Variable de estudio: Índice de desarrollo								
Tratamientos	30/7	30/15	30/21	30/30	30/38	30/45	30/52	30/60	30/124
Media \pm DS	82.8 \pm 6.8 CD	48.6 \pm 10.9 FG	21.5 \pm 7.9 I	32.6 \pm 15.2 I	41.6 \pm 10.9 HI	39.6 \pm 11.0 I	43.4 \pm 9.3 GH	44.9 \pm 11.0 FG	71.4 \pm 7.2 EF
C.V.	52.5	52.5	52.5	52.5	52.5	52.5	52.5	52.5	52.5
Varianza	47.3	120.2	63.8	232.1	120.3	122.7	88.2	123.1	52.2
Significativo al	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

15/7; donde el primer número indica tiempo sin exposición al CH y el segundo indica tiempo de exposición al CH, Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)

	Variable de estudio: Índice de desarrollo								
Tratamientos	45/7	45/15	45/21	45/30	45/38	45/45	45/52	45/60	45/109
Media \pm DS	36.5 \pm 14.2 I	27.7 \pm 9.8 I	37.8 \pm 7.2 I	32.3 \pm 10.1 I	40.4 \pm 12.0 I	43.0 \pm 11.8 HI	26.4 \pm 14.4 I	45.2 \pm 17.6 FG	25.2 \pm 9.3 I
C.V.	52.5	52.5	52.5	52.5	52.5	52.5	52.5	52.5	52.5
Varianza	201.6	97.7	52.8	103.0	145.1	139.7	207.4	312.7	88.0
Significativo al	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

15/7; donde el primer número indica tiempo sin exposición al CH y el segundo indica tiempo de exposición al CH, Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)

	Variable de estudio: Índice de desarrollo								
Tratamientos	60/7	60/15	60/21	60/30	60/38	60/45	60/52	60/60	60/94
Media \pm DS	36.9 \pm 12.5 I	29.4 \pm 16.8 I	24.3 \pm 12.1 I	23.3 \pm 9.8 I	39.4 \pm 7.5 I	22.5 \pm 7.6 I	18.1 \pm 10.1 I	23.7 \pm 13.0 I	31.8 \pm 12.0 I
C.V.	52.5	52.5	52.5	52.5	52.5	52.5	52.5	52.5	52.5
Varianza	156.8	283.5	148.1	96.2	57.1	57.9	102.7	169.1	146.3
Significativo al	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

15/7; donde el primer número indica tiempo sin exposición al CH y el segundo indica tiempo de exposición al CH, Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)

Anexo 3

Comparación de medias de Duncan para porcentaje de germinación de semillas de *Laelia speciosa* esterilizadas por filtración

	Variable de estudio: porcentaje de germinación								
Tratamientos	15/7	15/15	15/21	15/30	15/38	15/45	15/52	15/60	15/139
Media \pm DS	54.5 \pm 17.9A	75.5 \pm 13.0A	69.2 \pm 23.3A	79.0 \pm 13.2A	82.9 \pm 11.14B	69.3 \pm 16.19A	72.2 \pm 20.6A	77.7 \pm 17.8A	78.32 \pm 9.1 A
C.V.	8.2	1.8	3.8	7.2	3.9	3.9	5.3	8.4	2.5
Varianza	320.8	171.0	547.1	176.08	124.2	262.2	425.32	319.62	83.0
Significativo al	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

15/7; donde el primer número indica tiempo sin exposición al CH y el segundo indica tiempo de exposición al CH, Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)

	Variable de estudio: porcentaje de germinación								
Tratamientos	30/7	30/15	30/21	30/30	30/38	30/45	30/52	30/60	30/124
Media \pm DS	84.4 \pm 3.84B	54.5 \pm 8.2A	43.06 \pm 15.22A	48.99 \pm 17.36A	54.28 \pm 11.76A	52.5 \pm 10.5A	59.5 \pm 10.1A	62.0 \pm 10.5A	76.14 \pm 7.3A
C.V.	2.1	4.2	2.4	7.1	3.5	4.4	4.0	4.1	1.7
Varianza	14.7	67.8	231.75	301.49	138.38	111.18	103.97	110.53	53.84
Significativo al	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

30/7; donde el primer número indica tiempo sin exposición al CH y el segundo indica tiempo de exposición al CH, Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)

	Variable de estudio: porcentaje de germinación								
Tratamientos	45/7	45/15	45/21	45/30	45/38	45/45	45/52	45/60	45/109
Media \pm DS	43.6 \pm 15.20A	41.1 \pm 17.5A	46.6 \pm 11.9 A	63.9 \pm 19.7B	59.0 \pm 19.9A	51.6 \pm 12.9A	41.2 \pm 12.5A	61.90 \pm 21.8A	34.5 \pm 11.3A
C.V.	10.5	11.5	4.9	11.2	7.7	6.9	9.3	9.0	7.9
Varianza	231.10	307.8	143.9	391.2	397.0	167.8	157.9	477.6	128.2
Significativo al	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

45/7; donde el primer número indica tiempo sin exposición al CH y el segundo indica tiempo de exposición al CH, Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)

	Variable de estudio: porcentaje de germinación								
Tratamientos	60/7	60/15	60/21	60/30	60/38	60/45	60/52	60/60	60/94
Media \pm DS	54.0 \pm 17.6A	74.3 \pm 288.3A	33.1 \pm 15.8A	33.8 \pm 15.7A	55.3 \pm 15.8A	38.3 \pm 15.9A	46.2 \pm 17.1A	45.5 \pm 16.2A	58.6 \pm 18.4B
C.V.	6.2	8.2	12.4	11.0	6.8	17.4	11.5	10.2	9.6
Varianza	312.8	387.3	250.7	248.3	249.9	255.5	292.8	264.6	339.2
Significativo al	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

60/7; donde el primer número indica tiempo sin exposición al CH y el segundo indica tiempo de exposición al CH, Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)

Anexo 4

Comparación de medias de Duncan para porcentaje de germinación de semillas de *Laelia speciosa* esterilizadas por autoclave

	Variable de estudio: porcentaje de germinación								
Tratamientos	15/7	15/15	15/21	15/30	15/38	15/45	15/52	15/60	15/139
Media \pm DS	73.9 \pm 16.5A	76.9 \pm 10.3A	77.4 \pm 12.5A	76.3 \pm 18.8A	69.9 \pm 14.2A	66.2 \pm 18.4A	77.0 \pm 6.8A	49.5 \pm 17.1A	52.5 \pm 12.3A
C.V.	2.4	3.5	3.4	3.2	4.7	5.9	1.6	8.9	5.4
Varianza	272.2	107.8	156.2	356.5	202.8	340.3	47.0	294.8	153.5
Significativo al	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

15/7; donde el primer número indica tiempo sin exposición al CH y el segundo indica tiempo de exposición al CH, Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)

	Variable de estudio: porcentaje de germinación								
Tratamientos	30/7	30/15	30/21	30/30	30/38	30/45	30/52	30/60	30/124
Media \pm DS	40.0 \pm 14.2A	45.5 \pm 19.9A	50.8 \pm 17.4A	39.3 \pm 10.2A	49.1 \pm 21.6A	48.0 \pm 13.2A	45.7 \pm 17.8A	48.0 \pm 15.4A	77.3 \pm 7.3A
C.V.	5.9	10.1	6.1	4.4	10.5	6.0	6.9	16.8	3.4
Varianza	203.6	399.0	304.0	105.4	466.8	174.5	317.6	237.5	54.2
Significativo al	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

30/7; donde el primer número indica tiempo sin exposición al CH y el segundo indica tiempo de exposición al CH, Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)

	Variable de estudio: porcentaje de germinación								
Tratamientos	45/7	45/15	45/21	45/30	45/38	45/45	45/52	45/60	45/109
Media \pm DS	41.6 \pm 15.6A	42.2 \pm 14.4A	57.1 \pm 20.9A	36.6 \pm 13.18A	61.1 \pm 19.0A	55.5 \pm 22.3A	40.2 \pm 16.9A	57.0 \pm 14.8A	58.2 \pm 19.1A
C.V.	9.4	9.1	8.0	11.3	7.9	10.7	7.9	4.1	8.3
Varianza	243.7	208.5	440.9	173.9	362.7	501.5	287.3	219.6	366.4
Significativo al	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

15/7; donde el primer número indica tiempo sin exposición al CH y el segundo indica tiempo de exposición al CH, Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)

	Variable de estudio: porcentaje de germinación								
Tratamientos	60/7	60/15	60/21	60/30	60/38	60/45	60/52	60/60	60/94
Media \pm DS	46.7 \pm 18.2A	52.0 \pm 14.8A	54.7 \pm 15.9B	50.2 \pm 14.7B	56.0 \pm 15.2A	40.3 \pm 22.0A	55.1 \pm 21.4A	53.5 \pm 16.3A	28.6 \pm 20.5A
C.V.	19.5	5.6	8.3	7.47.0	7.0	12.9	9.0	7.7	17.0
Varianza	333.3	221.6	254.9	218.3	231.7	487.7	460.2	266.4	423.1
Significativo al	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

30/7; donde el primer número indica tiempo sin exposición al CH y el segundo indica tiempo de exposición al CH, Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)

Anexo 5

Comparación de medias de Duncan para índice de desarrollo de Semillas de *Laelia speciosa* esterilizadas por filtración

	Variable de estudio: índice de desarrollo								
Tratamientos	15/7	15/15	15/21	15/30	15/38	15/45	15/52	15/60	15/139
Media \pm DS	182.9 \pm 29.1A	205.7 \pm 24.7A	207.5 \pm 41.2A	230.5 \pm 31.6A	242.8 \pm 36.6A	214.8 \pm 36.1A	221.9 \pm 41.5A	226.9 \pm 35.7A	227.7 \pm 38.5A
C.V.	1.9	2.0	4.0	3.5	3.1	3.3	2.2	3.9	4.0
Varianza	849.5	614.9	1704.3	998.8	1344.8	1305.5	1730.1	1279.5	1485.6
Significativo al	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

15/7; donde el primer número indica tiempo sin exposición al CH y el segundo indica tiempo de exposición al CH, Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)

	Variable de estudio: índice de desarrollo								
Tratamientos	30/7	30/15	30/21	30/30	30/38	30/45	30/52	30/60	30/124
Media \pm DS	227.3 \pm 24.3A	184.5 \pm 21.7A	182.0 \pm 41.6A	190.7 \pm 42.7A	195.9 \pm 35.8B	189.1 \pm 29.5A	192.3 \pm 26.4A	197.1 \pm 31.6A	226.5 \pm 40.8A
C.V.	3.9	2.3	7.3	7.4	5.4	4.6	2.2	4.4	6.1
Varianza	591.0	474.2	1738.6	1827.5	1283.9	873.1	699.3	1001.4	1670.3
Significativo al	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

30/7; donde el primer número indica tiempo sin exposición al CH y el segundo indica tiempo de exposición al CH, Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)

	Variable de estudio: índice de desarrollo								
Tratamientos	45/7	45/15	45/21	45/30	45/38	45/45	45/52	45/60	45/109
Media \pm DS	179.8 \pm 34.1A	168.6 \pm 32.8A	172.6 \pm 22.6A	210.6 \pm 44.2A	189.4 \pm 28.7A	186.6 \pm 25.4A	168.2 \pm 25.6A	195.5 \pm 39.9A	158.1 \pm 24.2A
C.V.	5.1	5.4	1.9	5.4	2.4	4.4	2.8	5.1	4.1
Varianza	1164.4	1081.8	514.0	1959.8	828.9	647.3	655.8	1594.8	589.3
Significativo al	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

45/7; donde el primer número indica tiempo sin exposición al CH y el segundo indica tiempo de exposición al CH, Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)

	Variable de estudio: índice de desarrollo								
Tratamientos	60/7	60/15	60/21	60/30	60/38	60/45	60/52	60/60	60/94
Media \pm DS	187.6 \pm 32.4A	178.3 \pm 37.2A	155.8 \pm 28.5A	157.5 \pm 28.6A	193.3 \pm 32.8A	165.7 \pm 37.8A	180.1 \pm 35.7A	177.4 \pm 36.1A	207.3 \pm 50.3A
C.V.	2.9	6.9	5.0	4.1	3.2	7.9	5.4	6.2	7.3
Varianza	1052.7	1386.2	815.7	823.5	1075.9	1428.9	1278.5	1309.7	2530.7
Significativo al	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

60/7; donde el primer número indica tiempo sin exposición al CH y el segundo indica tiempo de exposición al CH, Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)

Anexo 6

Comparación de medias de Duncan para índice de desarrollo de semillas de *Laelia speciosa* esterilizadas por autoclave

	Variable de estudio: índice de desarrollo								
Tratamientos	15/7	15/15	15/21	15/30	15/38	15/45	15/52	15/60	15/139
Media \pm DS	199.4 \pm 27.1A	214.8 \pm 24.6A	226.1 \pm 28.8A	221.7 \pm 31.7A	214.7 \pm 33.5A	207.8 \pm 31.5A	215.5 \pm 24.9A	189.5 \pm 36.6A	193.2 \pm 31.5
C.V.	2.6	2.5	2.2	2.2	5.2	2.6	2.8	4.8	3.6
Varianza	734.9	607.1	835.0	1007.6	1125.8	994.4	622.3	1346.5	994.2
Significativo al	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

15/7; donde el primer número indica tiempo sin exposición al CH y el segundo indica tiempo de exposición al CH, Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)

	Variable de estudio: índice de desarrollo								
Tratamientos	30/7	30/15	30/21	30/30	30/38	30/45	30/52	30/60	30/124
Media \pm DS	170.9 \pm 30.6A	177.4 \pm 38.5A	182.1 \pm 32.0A	160.7 \pm 19.1A	184.0 \pm 45.6A	178.9 \pm 26.5A	173.5 \pm 31.2A	178.1 \pm 32.1A	209.4 \pm 28.5A
C.V.	5.3	9.5	3.5	1.9	1.9	2.3	5.2	5.2	4.5
Varianza	940.2	1484.3	1025.0	365.7	2080.3	703.9	975.4	1032.7	812.2
Significativo al	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

30/7; donde el primer número indica tiempo sin exposición al CH y el segundo indica tiempo de exposición al CH, Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)

	Variable de estudio: índice de desarrollo								
Tratamientos	45/7	45/15	45/21	45/30	45/38	45/45	45/52	45/60	45/109
Media \pm DS	162.9 \pm 25.3A	165.9 \pm 24.4 A	185.4 \pm 34.6A	156.7 \pm 20.5A	226.9 \pm 220.7A	191.1 \pm 38.5 A	164.2 \pm 28.7A	184.6 \pm 25.4A	188.3 \pm 36.4A
C.V.	4.3	3.5	3.9	3.0	7.6	4.9	3.7	2.6	1.9
Varianza	643.0	596.9	1198.6	420.4	48736.2	1483.8	829.2	645.8	1328.3
Significativo al	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

45/7; donde el primer número indica tiempo sin exposición al CH y el segundo indica tiempo de exposición al CH, Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)

	Variable de estudio: índice de desarrollo								
Tratamientos	60/7	60/15	60/21	60/30	60/38	60/45	60/52	60/60	60/94
Media \pm DS	178.9 \pm 36.4A	183.6 \pm 28.7A	191.7 \pm 34.5A	179.8 \pm 32.3A	188.8 \pm 29.9A	166.3 \pm 35.1A	185.1 \pm 35.4A	182.8 \pm 29.7A	147.1 \pm 35.9A
C.V.	8.2	2.8	4.7	4.8	3.1	7.0	4.3	3.1	7.6
Varianza	1325.1	829.2	1192.4	1047.6	894.1	1232.8	1259.3	882.5	1294.3
Significativo al	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

60/7; donde el primer número indica tiempo sin exposición al CH y el segundo indica tiempo de exposición al CH, Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)