



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Micropropagación y adaptación a  
condiciones ambientales de:  
*Prosthechea vitellina* (Lindl.) W. E. Higgins  
(Orchidaceae)**

**T É S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

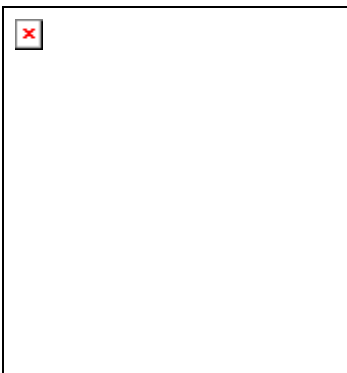
**B I Ó L O G O**

P R E S E N T A:

**ROSA MARÍA DE LA CRUZ RODRÍGUEZ**

**DIRECTOR: M en C. AMADEO BARBA ÁLVAREZ**

México, D. F. 29 de Noviembre de 2006.





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Este trabajo fue realizado bajo la dirección  
del  
Maestro en Ciencias Amadeo Barba Álvarez,  
en  
La Unidad de Investigación en Biología Vegetal  
en  
La Facultad de Estudios Superiores Zaragoza  
de  
La Universidad Nacional Autónoma de México.**

# AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, que ha sido mi casa de noche y de día durante todos estos años y donde he encontrado un mundo de conocimientos para mi formación en un gran número aspectos, porque nunca me cerró las puertas y porque sin una Universidad como ésta no podría haber cursado una carrera profesional, es mi mayor orgullo ser universitaria, no concibo a mi país México sin la UNAM, amo sus colores, su escudo, su historia, sus escuelas, y toda la gente valiosa que hay dentro de ella, porque con nada te pago tanto que me has dado te doy las más encarecidas *¡gracias!*, mi querida UNAM.

Al M. en C. Amadeo Barba Álvarez, por dirigir esta tesis, por las facilidades otorgadas para llevar a cabo este trabajo. No hay palabras para agradecerle suficientemente todo, porque me brindó su apoyo y ayuda incondicional, porque además de sus enseñanzas, encontré en usted comprensión, amistad y paciencia. Agradezco que sea un verdadero maestro que no solo se limita al desempeño académico sino que sea sensible ante las dificultades y problemas de sus alumnos porque es un gran amigo, le debo en gran parte mi titulación, porque fue solidario conmigo en todo momento y porque sobre todo confió en mí, le estaré siempre agradecida, ¡gracias! por ser un maestro ***¡extraordinario!***

A la M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales, por todo su apoyo, su amabilidad y confianza, por sus comentarios y conocimientos aportados para el mejor desarrollo de este trabajo, y también por orientarme un gran número de veces durante el desarrollo de mi investigación, además de maestra una gran amiga que en momentos verdaderamente difíciles estuvo conmigo, por su disponibilidad y profesionalismo.

A la M. en C. Balbina Vázquez Benítez, quién con su crítica constructiva se constituyó en una gran aportación para la estructuración de la presente tesis, desde tiempo atrás compartió una gran cantidad de conocimientos y enseñanzas conmigo como su alumna, siempre pendiente, atenta y con gran disposición al trabajo inspiró en mí gran confianza, me infundió ánimo varias veces, además de distinguirme con el favor de su amistad invaluable para mí.

Al Biólogo Juan Romero Arredondo, por el tiempo dedicado al mejoramiento de este trabajo y por la disposición y facilidades otorgadas, agradezco sus atinados comentarios y conocimientos, su trato siempre amable, sus consejos y valiosas aportaciones, los momentos en que me brindó apoyo en la búsqueda y recopilación de información.

A la Dra. Hortensia Rosas Acevedo, por su apoyo y gran aportación a este trabajo, el tiempo dedicado a la revisión exhaustiva para una mejor organización de la información, sus comentarios siempre acertados que enriquecieron en gran medida la calidad y el contenido, por sus palabras de aliento, y por las facilidades otorgadas.

De manera muy especial a la M. en C. Eloisa Guerra quién con sus consejos encontró la manera de estimularme, para no darme por vencida en momentos en que me parecía imposible seguir adelante, durante toda la carrera sus palabras me han acompañado ya que llegaron muy profundo en mi ánimo y me hicieron recapacitar, por lo que le estoy infinitamente agradecida y la recuerdo constantemente, si todos fueran tan afortunados de encontrar una persona como ella que tuviera las palabras precisas en un momento difícil, creo que muchos mantendrían claro y firme el camino, por su tiempo y confianza. A la jefa de carrera de Biología Marisela Arteaga por todas las atenciones que me brindó durante la carrera y mi titulación, por su amabilidad y confianza.

A todos mis maestros quienes a lo largo de la carrera impartieron sus conocimientos y compartieron conmigo pero también se hicieron mis amigos: Eloisa, Laguna, Raúl, Eloy, Alejandrina, Juan, Montoya, Joel, Niki Otani, Manuel, David, Elvia, Balbina, Rosalva, Arcadio, Maria Elena, Dolores, Magdalena, Ma del Carmen, Aida, Angélica, Paty y Armando Cervantes, Isaías, Bertha, Marisela V, Paty Velasco, Lety, entre otros.

A todos mis compañeros que son muchos, pues tuve la suerte de compartir con un gran número de jóvenes valiosos todos ellos, distintos pero grandes personas que me aceptaron como parte de su grupo me ayudaron, me apoyaron, acompañaron y brindaron su amistad, los estimo profundamente compartimos juntos tristezas, alegrías sinsabores, hambre, dolor y cansancio pero también muchas satisfacciones, no quisiera haber olvidado a ninguno porque para mi son como una familia, el tiempo que compartimos no fue poco y lo que vivimos menos, quiero que sepan que los recuerdo y estimo a todos: Paty I, Paty II, Hugo I, Tayson, Griselda, Abel, Florencia, Inés, Miriam, Ulises, Beatriz, Beatriz F, Eloy, Miguel Angel, Yadira, Sandra, Juan, Luis Miguel, Miguel, Carmen, Senia, Teresa, Lizbeth, Claudia, Alejandra, Gerardo, Edna, Genaro, Julissa, Anita, Yolanda I, Yolanda II, Fabiola, Vicente, Selene, Angélica, Germán, Jorge, Eloisa, Antelmo, Elvira, Israel, Mario, Hugo S, Susana, Alicia, Mariano, Raquel, entre otros, a todos con todo mi cariño ***¡muchas gracias!***

# Dedicatorias

*¡Dedico ésta tesis y doy gracias!*

A **Dios**, por la vida que me dio, por iluminarme y acompañarme en todos los momentos malos y buenos, porque nunca me ha abandonado, por permitirme lograr mi formación profesional.

A **mis padres**, Agustina Rodríguez Pérez y Juan De la Cruz Garcés †, seres ambos ¡extraordinarios! de los que me siento orgullosa, que con sus consejos, enseñanzas y ejemplo, forjaron en mi un carácter y espíritu de superación y constancia que me han permitido alcanzar una de mis mayores ambiciones, gracias mamá por amarme y confiar en mi a pesar de tantos tropiezos, por el apoyo que me has dado para ayudarme a llegar, eres mi ejemplo eres **¡excepcional!**.

A **mis hermanos**, compañeros incomparables de mi vida Susana y Roberto, quienes siempre han confiado en mí, porque nunca me han abandonado, por el amor que siempre me manifiestan y que agradezco, solidarios en todo momento, por su ayuda incondicional, por su confianza a pesar de mis errores y porque sin importar la distancia siempre han estado presentes para mí, ambos **¡incomparables!**.

A **mis hijos**, Pablo, Rosa Ivette y Elizabeth, los seres más maravillosos que puede tener una madre, además de hijos y compañeros, son mis mejores amigos, son mis grandes amores y la razón de mi vida, por ustedes ha valido la pena vivir y superarme, y porque en este trabajo está también la fe, el amor y el trabajo de mis tres hijos, espero sigamos siendo el mejor equipo siempre unidos como hasta ahora, recuerden que mientras seamos un puño cerrado nada ni nadie nos podrá vencer. Perdón por mis errores, solo puedo decirles no puedo pedir nada más a la vida **¡porque los tengo a ustedes gracias!**.

A **Jorge Pulido Urbina**, esposo y compañero fiel, amigo silencioso, que ha sacrificado todo por apoyarme y ayudarme a llegar al final de mi meta, que en todo momento me ha demostrado su amor con su paciencia y comprensión, estando siempre presente sin esperar nada, eres una de las personas más importantes de mi vida y de mi formación profesional, sin ti no sería posible esta realidad, tu apoyo es parte muy importante de mi trabajo, y no existen palabras que te hagan justicia, espero recompensarte por todo, porque lo mereces y te lo has ganado a pulso, este logro también es tuyo porque siempre has estado ahí y te estaré por siempre agradecida con todo mi amor te doy **¡mil gracias!**.

A mis **amigas**, Ana Romero, Sara Cobos y Georgina López, por distinguirme con el honor de su amistad, durante más de 25 años, por el apoyo y confianza en tiempos difíciles, somos grandes amigas desde nuestra muy cercana juventud, y aunque a veces no nos vemos muy seguido sé que puedo confiar en su amistad leal y sincera, quiero que sepan que también yo guardo un gran sentimiento hacia ustedes, es mi deseo que nuestra amistad perdure por mucho tiempo más y que podamos estar juntas más tiempo. Existen muy pocos amigos en la vida pero yo tengo mucha suerte porque tengo muchos **¡Gracias Dios!**.

# ÍNDICE

## INTRODUCCIÓN

### 1. LAS ORQUÍDEAS

1.1	DIVERSIDAD	1
1.2	IMPORTANCIA	1
1.2.1	Biológica	1
1.2.2	Económica	1
1.3	DISTRIBUCIÓN DE LAS ORQUÍDEAS	
1.3.1	Mundial	1
1.3.2	Nacional	2
1.4	PROBLEMÁTICA DE LA FAMILIA <i>Orchidaceae</i>	
1.4.1	Biológica	2
1.4.2	Ecológica	3
1.4.3	Comercial	3

### 2. MARCO TEÓRICO.

#### 2.1 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS

2.1.1	Estructuras especializadas	4
2.1.1.1	Morfología floral	4
2.1.1.2	Morfología de las raíces	4
2.1.1.3	Morfología de las hojas	5
2.1.1.4	Morfología del tallo	5
2.1.1.5	Simbiosis estricta	5

#### 2.2 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS

2.2.1	Polinarios	6
2.2.2	Polinización	6
2.2.3	<i>Prosthechea vitellina</i>	6
2.2.4	Distribución de <i>Prosthechea vitellina</i>	7
2.2.5	Descripción de <i>Prosthechea vitellina</i>	8

#### 2.3 SEMILLAS DE ORQUÍDEA

2.3.1	Viabilidad	11
2.3.2	El embrión en las orquídeas	12

#### 2.4 GERMINACIÓN

2.4.1	Germinación de las orquídeas	13
2.4.1.1	El cultivo <i>in vitro</i> de semillas	13
2.4.2	Germinación asimbiótica	16



## **2.5 PROPAGACIÓN MASIVA *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS POR SEMILLA**

<b>2.5.1</b>	<b>Aplicaciones</b>	17
<b>2.5.2</b>	<b>Potencial</b>	17
<b>2.5.3</b>	<b>Medio de cultivo</b>	18
2.5.3.1	Influencia de la composición del medio de cultivo en la germinación	18
2.5.3.2	Medio nutritivo Murashige-Skoog (MS)	19
2.5.3.3	Medio MS en la germinación asimbiótica de semillas de orquídeas	19
2.5.3.4	Factores físicos de incubación <i>in vitro</i>	20

## **2.6 CARACTERÍSTICAS DE PLANTAS PROPAGADAS *IN VITRO***

<b>2.6.1</b>	<b>Morfología y anatomía</b>	20
<b>2.6.2</b>	<b>Fisiología</b>	21
<b>2.6.3</b>	<b>Aclimatización</b>	21

## **2.7 TRASPLANTE DE PLÁNTULAS DE *IN VITRO* A *EX VITRO***

<b>2.7.1</b>	<b>Factores biológicos que influyen en el trasplante</b>	21
2.7.1.1	Tamaño de la plántula y estructuras presentes	22
2.7.1.2	Enfermedades y plagas en invernadero	22
<b>2.7.2</b>	<b>Factores físicos que influyen en el trasplante</b>	
2.7.2.1	Humedad relativa	23
2.7.2.1	Riego	23
2.7.2.2	Ventilación, luz y temperatura	24
2.7.2.3	Tipos de sustrato y características	24
2.7.2.4	Soluciones nutritivas y fertilización	26

## **2.7 REINTRODUCCIÓN DE ORQUÍDEAS A ZONAS NATURALES**

<b>2.7.1</b>	<b>Antecedentes de reintroducción</b>	27
<b>2.7.2</b>	<b>Sobrevivencia de las plantas reintroducidas</b>	28
2.7.2.1	Factores que afectan la sobrevivencia	28
2.7.2.2	Periodo de adaptación en campo	29

### **2.7.3 Factores físicos que participan en la aclimatación en campo de las plantas**

2.7.3.1	Humedad y temperatura	29
2.7.3.2	Iluminación	30

### **2.7.4 Transplante a campo**

## **2.8 CONSERVACIÓN**

### **2.8.1 PROBLEMÁTICA Y JUSTIFICACIÓN**

## **3. OBJETIVOS**

<b>3.1</b>	<b>GENERAL</b>	32
<b>3.2</b>	<b>PARTICULARES</b>	32

<b>4. METODOLOGÍA</b>	<b>32</b>
<b>4.1 FASE DE LABORATORIO</b>	
4.1.1 Material biológico	32
4.1.2 Viabilidad de las semillas	32
4.1.3 Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)	33
4.1.4 Desinfestación y siembra de semillas <i>in vitro</i> en medio de cultivo	33
4.1.5 Germinación y desarrollo <i>in vitro</i>	35
4.1.5.1 Desarrollo de las plantas <i>in vitro</i>	35
<b>4.2 FASE DE INVERNADERO</b>	
4.2.1 Preacondicionamiento de las plantas para la siembra	35
4.2.2 Sustratos para siembra <i>ex vitro</i>	36
4.2.3 Recipientes para trasplante <i>ex vitro</i> de plántulas	36
4.2.4 Trasplante de las plantas a <i>ex vitro</i>	36
4.2.5 Aclimatización de plantas a condiciones de Invernadero	36
<b>4.3 FASE DE CAMPO</b>	
4.3.1 Reintroducción de las plantas en su hábitat natural	38
4.3.1.1 Registro de crecimiento y sobrevivencia de las plantas	38
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
<b>5.1 Germinación</b>	<b>40</b>
5.1.1 Evaluación de la viabilidad	40
5.1.2 Desarrollo ontogénico	41
5.2.3 Medio nutritivo MS	46
<b>5.2 Aclimatización de plantas de <i>Prosthechea vitellina</i> a condiciones <i>ex vitro</i></b>	<b>47</b>
5.2.1 Efecto de la vía de aclimatización en el desarrollo de las plantas de <i>Prosthechea vitellina</i>	47
5.2.2 Comparación del desarrollo de estructuras y de las plantas de <i>Prosthechea vitellina</i> al inicio y al final de la prueba en las dos vías de aclimatización (invernadero y cámara de incubación)	52
5.2.3 Comparación del desarrollo de las plantas de <i>Prosthechea vitellina</i> y sus estructuras en los tres rangos de tamaño	55
<b>5.3 Aclimatización de las plantas de <i>Prosthechea vitellina</i> a condiciones de invernadero</b>	<b>58</b>
5.3.1 Sustratos	58
5.3.1.1 Resultados cuantitativos de las mezclas experimentales de sustrato en el desarrollo de plantas de <i>Prosthechea vitellina</i>	62
5.3.2 Recipientes de siembra	66
<b>5.4 Aclimatización de las plantas germinadas <i>in vitro</i> a condiciones naturales</b>	<b>70</b>
5.4.1 Liberación de plantas en campo	70

<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>75</b>
<b>7. ESPECTATIVAS</b>	<b>76</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>77</b>
Fig 1. DISTRIBUCIÓN DE <i>Prosthechea vitellina</i> (Hágsater y Salazar, 1990)	7
Fig 2. <i>Prosthechea vitellina</i> citado por (Hágsater y Salazar, 1990)	9
Fig 3. MORFOLOGÍA DE <i>Prosthechea vitellina</i> (Hágsater y Salazar, 1990)	10
Fig 4. Diagrama de procedimiento de desinfestación pruebas de viabilidad y siembra de semillas <i>in vitro</i>	34
Fig. 5. Diagrama de la fase de invernadero de <i>Prosthechea vitellina</i>	37
Fig. 6. Diagrama de reintroducción de plantas a campo de <i>Prosthechea vitellina</i>	39
Fig. 7. Vista en estereoscopio de una semilla de <i>Prosthechea vitellina</i> con embrión (Estadio1)	40
Fig. 8. Vista en microscopio de embriones teñidos de semillas de <i>Prosthechea vitellina</i> en TTC	40
Fig. 9. Protocormo de <i>Prosthechea vitellina</i> sin testa se observa el polo apical	41
Fig. 10. Protocormos de <i>Prosthechea vitellina</i>	41
Fig. 11. Morfología de la germinación <i>Prosthechea vitellina</i> a 110 a 140 días estadios 2 y 3	42
Fig. 12. Estadio 4 del desarrollo de <i>Prosthechea vitellina</i> a 150 días de sembradas	42
Fig. 13. Morfología del desarrollo de <i>Prosthechea vitellina</i> estadios 4 al 8	42
Fig. 14. Estadio 5 del desarrollo de <i>Prosthechea vitellina</i> con una raíz verdadera	43
Fig. 15. Estadio 6 del desarrollo de <i>Prosthechea vitellina</i> . estadio 5	43
Fig. 16. Estadio 7 del desarrollo la germinación de <i>Prosthechea vitellina</i>	43
Fig. 17. Estadio 8 del desarrollo de <i>Prosthechea vitellina</i>	43
Fig. 18. Gráfica de germinación <i>in vitro</i> de <i>Prosthechea vitellina</i>	45
Fig. 19. Protocormos de <i>Prosthechea vitellina</i> en medio MS	46
Fig. 20. Preparación de mezclas de sustratos para siembra de <i>Prosthechea vitellina</i> a condiciones de invernadero	58
Fig. 21. <i>Prosthechea vitellina</i> aclimatizada en invernadero en mezcla 1 (esfagnum + agrolita + carbón activado)	58
Fig. 22. Plantas de <i>Prosthechea vitellina</i> autótrofas en mezclas de sustratos	59
Fig. 23. Planta aclimatizadas en invernadero con estructuras foliares y radicales vigorosas	59
Fig. 24. <i>Prosthechea vitellina</i> al final de la aclimatización	60
Fig. 25. Sustratos utilizados para las tres mezclas en la aclimatización de <i>Prosthechea vitellina</i> a) encino b) carbón c) agrolita y d) esfagnum	61
Figs. 26. a) y b). Siembra de plantas de <i>Prosthechea vitellina</i> en botellas para su aclimatización a condiciones de invernadero en sustrato	67
Fig. 27. Plantas de <i>Prosthechea vitellina</i> de invernadero en sustrato de esfagnum + corteza de encino + agrolita	67
Fig. 28. Plantas de <i>Prosthechea vitellina</i> aclimatizadas en invernadero en mezcla de esfagnum + corteza de encino + agrolita	68
Fig. 29. Plantas de <i>Prosthechea vitellina</i> en mezcla de esfagnum + corteza de encino + carbón activado	68
Figs. 30. a, b, c. Exploración en campo de la zona de liberación de plantas de <i>Prosthechea vitellina</i>	70
Figs. 31. a y b. Plantas de <i>Prosthechea vitellina</i> en rama de encino liberadas en campo	71
Fig. 32. Liberación de plantas de <i>Prosthechea vitellina</i> en una zona natural	71
Figs. 33 y 34. Plantas colocadas en ramas de encino amarradas al tronco de árboles de encino	72
Figs. 35 y 36. Ramas de encino sin plantas de <i>Prosthechea vitellina</i> a seis meses de liberadas en campo	72
Fig. 37. Ramas de encino sin plantas de <i>Prosthechea vitellina</i> a seis meses de liberación	73
Figs. 38 a; b; c; y d. Situación en que se encontraron las ramas de encino que portaban las plantas de <i>Prosthechea vitellina</i> después de seis meses de liberadas en campo	74

Cuadro 1. Propiedades comparativas de los medios más usados en orquídeas	25
Cuadro 2. Composición química de la solución fertilizante para orquídeas	26
Cuadro 3. Descripción de estadios de desarrollo de <i>Prosthechea vitellina</i>	41
Cuadro 4. Número de estadios y descripción morfológica de c/u durante la germinación <i>in vitro</i> de <i>Prosthechea vitellina</i>	45
Cuadro 5. Características de las mezclas utilizadas en la aclimatización de <i>Prosthechea vitellina</i>	61
Cuadro 6. Valores de las plantas aclimatizadas en la mezcla 1 (esfagnum + agrolita + carbón)	62
Cuadro 7. Plantas aclimatizadas en invernadero en sustrato 2 (esfagnum + agrolita + encino)	62
Cuadro 8. Valores promedio de las plantas aclimatizadas en la mezcla (esfagnum + encino + carbón)	63
Cuadro 9. Número de estructuras promedio producidas en la aclimatización de <i>Prosthechea vitellina</i> en tres mezclas experimentales	63
Cuadro 10. Longitud final promedio de estructuras en la aclimatización de plantas de <i>Prosthechea vitellina</i> en tres mezclas experimentales	64
Cuadro 11. Promedio de número de estructuras en la aclimatización de <i>Prosthechea vitellina</i> en tres mezclas	65
Cuadro 12. Longitud promedio de las estructuras durante la aclimatización de <i>Prosthechea vitellina</i> en tres mezclas	66
Cuadro 13. Resultados obtenidos de las plantas liberadas en campo de <i>Prosthechea vitellina</i> después de seis meses	75
Cuadro 14. Registro de los organismos encontrados en el sustrato a los seis meses de la liberación las plantas de <i>Prosthechea vitellina</i>	75
<b>GRAFICA 1.</b> Diferencias en el número de hojas en respuesta a la aclimatización vía invernadero y vía cámara de incubación	47
<b>GRAFICA 2.</b> Diferencias en longitud de las hojas 6 meses después de la aclimatización en invernadero y cámara de incubación	48
<b>GRAFICA 3.</b> Diferencias en el número de raíces por las vías de aclimatización invernadero y cámara de incubación	48
<b>GRAFICA 4.</b> Diferencias en la longitud total de las raíces al final de la aclimatización en invernadero y cámara de incubación	49
<b>GRAFICA 5.</b> Diferencia en la longitud total final de las plantas en aclimatización en invernadero y en la cámara de incubación	49
<b>GRAFICA 6.</b> Diferencia en el número de hojas por tamaño (rango) de la planta	50
<b>GRAFICA 7.</b> Diferencias en la longitud de las hojas y el tamaño de las plantas al final de la aclimatización	50
<b>GRAFICA 8.</b> Diferencias entre el número de raíces y el rango de las plantas al final de la aclimatización	51
<b>GRAFICA 9.</b> Diferencias en la longitud total de las raíces y el tamaño (rango) de las plantas al final de la aclimatización	51
<b>GRAFICA 10.</b> Diferencias en la longitud total de las plantas y el tamaño de las plantas en la aclimatización	52
<b>Gráficas A1. y A2.</b> Efecto de la vía de aclimatización en la formación de hojas	52
<b>Gráficas B1. y B2.</b> Efecto de la vía de aclimatización en la longitud de las hojas	53
<b>Gráficas C1. y C2.</b> Efecto de la vía de aclimatización en la formación de raíces	53
<b>Gráficas D1. y D2.</b> Efecto de la vía de aclimatización en el incremento en la longitud de las raíces	54
<b>Gráficas E1. y E2.</b> Efecto de la vía de aclimatización en el incremento de la longitud total de las plantas	54
<b>Gráficas F1. y F2.</b> Efecto del rango de tamaño de las plantas en la formación de hojas	55
<b>Gráficas G1. y G2.</b> Efecto del rango de tamaño de las plantas en el incremento de longitud de las hojas	55
<b>Gráficas H1. y H2.</b> Efecto del rango de tamaño de las plantas en la formación de raíces	56

<b>Gráficas I1. y I2.</b> Efecto del rango de tamaño de las plantas en el incremento de la longitud de las raíces	56
<b>Gráficas J1. y J2.</b> Efecto del rango de tamaño de las plantas en el incremento de la longitud total de las plantas	57
Gráfica de cuadro 6. Crecimiento y desarrollo de estructuras en la aclimatización de <i>Prosthechea vitellina</i> en mezcla 1 (esfagnum + agrolita + carbón)	62
Gráfica de cuadro 7. Crecimiento y desarrollo de estructuras en la aclimatización de <i>Prosthechea vitellina</i> en mezcla 2 (esfagnum + agrolita + encino)	62
Gráfica de cuadro 8. Estructuras generadas en la aclimatización de <i>Prosthechea vitellina</i> en mezcla 3 (esfagnum + encino + carbón)	63
Gráfica de cuadro 9. Estructuras generadas en la aclimatización de plantas de <i>Prosthechea vitellina</i> en tres mezclas	63
Gráfica de cuadro 10. Crecimiento de estructuras producidas en la aclimatización de plantas de <i>Prosthechea vitellina</i> en tres mezclas	64
Gráfica de cuadro 11. Comparación de estructuras al inicio y al final de la aclimatización de <i>Prosthechea vitellina</i> en tres mezclas	65
Gráfica del cuadro 12. Crecimiento de estructuras al inicio y al final de la aclimatización de <i>Prosthechea vitellina</i>	66

## RESUMEN.

*Prosthechea vitellina* (Lindley) W. E. Higgins es una orquídea epífita con una inflorescencia rojo escarlata o anaranjada y un labelo amarillo intenso que la hace especialmente atractiva, por lo que ha sido explotada por más de 150 años, tiene una importancia hortícola considerable por su demanda en el extranjero y en el mercado nacional. En México se encuentra distribuida en varios lugares como son Sierra de Veracruz, Puebla, Oaxaca y Chiapas además de Centroamérica (Guatemala y El Salvador). Se localiza a una Altitud de 1500 a 2600 m en bosques de pino y encino, de encino, bosques de niebla, con suelos de muy poca maleza, achaparrado de pedregal de lava (volcánicos).

La destrucción de su hábitat natural, la sobrecolecta indiscriminada de plantas y la explotación comercial de sus inflorescencias la ha llevado al grado de estar sujeta a protección especial para disminuir su amenaza de extinción. Existe un escaso conocimiento de la biología de esta especie y en particular se desconoce totalmente el proceso de su germinación y el desarrollo ontogénico del embrión hasta la formación de una planta completa. Además es difícil lograr la aclimatización de plantas de orquídeas obtenidas *in vitro* ya que no se pueden extrapolar o trasponer procedimientos de una especie a otra ya que sus requerimientos son diferentes y existen factores ambientales microclimáticos muy particulares que determinan su desarrollo, por lo que para conocerlos se requiere hacer estudios específicos y practicar numerosas pruebas.

El material biológico que se utilizó fueron semillas de cápsulas no dehiscentes y sanas provenientes de plantas de *Prosthechea vitellina* procedentes de Huauchinango Puebla, cada cápsula se desinfectó exteriormente, se abrió la cápsula haciendo un corte longitudinal liberando las semillas, se les realizaron pruebas de viabilidad con cloruro de trifetil tetrazolio (TTC) a lotes de semillas de cada una de las cápsulas colectadas.

Para la siembra *in vitro* de semillas y plántulas de *Prosthechea vitellina* se utilizó el medio nutritivo Murashige y Skoog se llevó registro de la germinación, haciendo revisiones periódicas y evaluando durante 280 días los cambios cualitativos que se observaron en la estructura de las semillas y plántulas. Posteriormente se hicieron resiembras cada dos meses, en medio de cultivo fresco MS para el crecimiento de las plántulas. Se individualizaron las plantas en tubos de ensayo hasta que presentaron más de dos estructuras foliares y radicales, que se apreciaran vigorosas con una longitud total mayor a 1.5 cm que permitió iniciar su adaptación a condiciones *ex vitro*.

Las plantas completas y bien desarrolladas se clasificaron en tres rangos y se trasplantaron utilizando tres mezclas de sustratos distintas para determinar la más favorable para el desarrollo de las plantas. Los recipientes utilizados para la siembra de las plantas fueron botellas medianas de polietileno poliestalato transparente (PET) de 600 mL resultando muy útiles y prácticas para la aclimatización.

Durante seis meses se registraron los cambios cualitativos de las plantas y sus estructuras, además de las cualidades de las mezclas. Se analizaron los datos obtenidos mediante una Prueba de Tukey (95%) para comparar las diferencias de cada uno de los parámetros registrados al inicio y al término de la prueba de aclimatización entre plantas preacondicionadas previamente en invernadero y en la cámara de incubación, en invernadero fue la más apropiada, así como de las plantas dependiendo del rango de altura, siendo el rango dos el que mejor resultado dio.

Por último se llevaron las plantas a un bosque de pino y encino templado lluvioso de donde procedieron las plantas madre para evaluar la sobrevivencia. A los seis meses se hizo una visita a la zona de liberación de las plantas para evaluar del número de plantas, el estado de las mismas y la sobrevivencia misma que fue prácticamente de 0%.

# INTRODUCCIÓN

## 1. LAS ORQUÍDEAS

### 1.1 DIVERSIDAD

Las orquídeas constituyen una de las mayores familias de plantas vasculares que existe. Estimaciones señalan que hay 35 000 especies (Camarillo y Rivera, 1990), Taxonómicamente son un grupo único de plantas (Larson, 1988).

Las orquídeas son plantas monocotiledóneas, los miembros de la familia Orchidaceae comprenden más de 900 géneros es una de las familias más diversas de plantas con flores que ocupan un amplio rango de hábitats, presentan estructuras y características fisiológicas altamente especializadas (Yu y Goh, 2001).

En general son plantas herbáceas, perennes, que pueden ser terrestres, epífitas, a veces palustres (acuáticas) y también subterráneas; con o sin rizoma, y/o con tubérculos. Los tallos pueden ser erguidos, trepadores o rastreros. Pueden tener bulbos, tallos tuberosos, hojas de muy variadas formas (Caneva, 1978).

### 1.2 IMPORTANCIA

#### 1.2.1 Biológica

Estas plantas presentan intrincadas relaciones con su ambiente y se establecen en una enorme variedad de hábitats, como consecuencia las formas y hábitos de crecimiento son extraordinariamente diversos (Camarillo y Rivera, 1990). Este es un grupo muy evolucionado con adaptaciones altamente especializadas para atraer insectos y realizar una eficiente polinización cruzada (Dressler, 1981a).

Entre las complejas correspondencias que establecen con otros organismos destacan la necesidad de la presencia de un hongo probablemente específico en alguna etapa de la germinación, los vínculos con un número limitado de polinizadores y en el caso de las epífitas, la preferencia por determinados tipos de soportes.

Estas características de las orquídeas tal vez las hacen muy vulnerables a los cambios ambientales y a la alteración. Muchas especies crecen en áreas y ambientes muy restringidos, siendo con frecuencia endémicas de una cadena montañosa o de zonas poco extensas (Camarillo y Rivera, 1990).

#### 1.2.2 Económica

El comercio de flores cortadas muestra una posición significativa en el mercado. Así como los floristas buscan nuevas flores cortadas para satisfacer la demanda de los consumidores, más y más orquídeas son utilizadas en la elaboración de ramos y arreglos. Por décadas, las orquídeas han sido consideradas un lujo en donde las flores se adquieren para uso comercial y doméstico (Britt, 1999).

La producción, exportación y venta de flor cortada se ha convertido en una actividad muy rentable y productiva siendo una fuente de trabajo de gran cantidad de personas dedicadas a la producción masiva de flores y plantas, en un país como México que presenta gran diversidad de climas y condiciones que son propicias para dicha actividad se convierte en un recurso sustentable en muchas regiones del país (Britt, 1999).

### 1.3 DISTRIBUCIÓN DE LAS ORQUÍDEAS

#### 1.3.1 Mundial

Las orquídeas tienen un amplio rango de distribución. Se presentan en todas partes del mundo excepto, tal vez en la Antártica y las regiones desérticas. De acuerdo con su distribución, las orquídeas se sitúan en dos grupos; templado y tropical. El primero inicia en regiones templadas del hemisferio norte de Europa, el norte de Asia y Norteamérica.

Las condiciones climáticas en estas regiones son caracterizadas por drásticas variaciones estacionales y un mínimo de calor y lluvia. Las especies de orquídeas de este grupo aquí son invariablemente terrestres y con excepción de *Diandre* son tuberosas, constituyendo la más primitiva de todas las formas. Por otro lado, la población de orquídeas tropicales comprende especies que son terrestres y epífitas, este último superior en número y forma (Abraham y Vatsala 1981).

Las orquídeas habitan, entre los 68° de latitud norte y los 56° de latitud sur. Los países tropicales e intertropicales son los que poseen más orquídeas, algunos de cotas bajísimas (nivel del mar) y por lo tanto de estaciones sumamente cálidas y otras a altitudes muy grandes, hasta 4000 m y por consiguiente de estaciones frías (Caneva, 1978).

### 1.3.2 Nacional

La mayoría de las orquídeas mexicanas se localizan al sur del Trópico de Cáncer, Wiard (1987) divide la República Mexicana en seis regiones geográficas de acuerdo a sus distintas características: Cordillera Central, Meseta Central, Noroeste de México, Vertiente del Golfo, sur de México y sureste de México (Luna y Barba, 1995).

Las especies de orquídeas mexicanas se localizan principalmente en la Cordillera Central, en la Meseta Central y sur de la vertiente del Golfo y en el sur de México. En la mayoría de los estados que comprenden la región Noroeste de México se localizan algunas orquídeas nativas, mientras que en la región sureste el número de especies es pequeño, sin embargo, algunas de las especies que se encuentran en ésta región no se localizan en ninguna otra parte.

Considerando éstas regiones, los estados con mayor riqueza de orquídeas son: Puebla, Morelos, Michoacán, San Luis Potosí, Veracruz, Oaxaca, Guerrero, Chiapas, Estado de México, Jalisco, Nayarit, Tamaulipas, Sinaloa, Tlaxcala, Hidalgo, Querétaro, Guanajuato, D.F., Colima, Nuevo León, Durango, Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo (Luna y Barba, 1995).

Aunque el número de especies mexicanas es menor que el de otros países de América tropical (Colombia, Ecuador, Perú, Brasil, entre otros), México cuenta con un conocimiento taxonómico más avanzado de sus especies. En un estudio realizado por Soto (1995) se habla de 1106 especies y subespecies mexicanas descritas, distribuidas en 159 géneros. De éstas, señala: "existen 444 especies o subespecies endémicas, las cuales corresponden a 40% del total registrado en el país. Esta característica convierte a la orquideoflora mexicana en una de las más ricas en endemismos entre los principales países de América tropical, quizá sólo superada por Brasil". Aunque todavía no se cuenta con un inventario completo de orquídeas, muchas áreas de nuestro país cuya flora no había sido estudiada, comienzan a ser de gran interés para los botánicos ([www.conabio.gob.mx/institucion/conabio\\_espanol/doctos/orquidea.html](http://www.conabio.gob.mx/institucion/conabio_espanol/doctos/orquidea.html)).

## 1.4 PROBLEMÁTICA DE LA FAMILIA Orchidaceae

### 1.4.1 Biológica

Según Rzedowsky (Martínez 1991) los métodos de destrucción y perturbación de la vegetación han sido diversos, algunos de ellos de efecto directo y otros indirecto.

Entre los factores directos cabe mencionar como principales: la tala desmedida, desmonte de bosques y selvas tropicales debido a la expansión de la agricultura y ganadería, la explotación selectiva e irracional de algunas especies útiles económicamente, la quema de los bosques con fines de limpieza, las inundaciones de grandes extensiones de terreno para el desarrollo de presas generadoras de energía eléctrica, etc. (Martínez, 1991).

Uno de los grupos de plantas que se ha visto sumamente afectado por estos problemas es la familia Orchidaceae, que cuenta en nuestro país con un considerable número de especies que se encuentran amenazadas por la destrucción de su hábitat y la sobre colecta. Estos son dos factores principales para que las orquídeas se vean amenazadas (Ramírez, 1990).

Numerosas especies de orquídeas perecen al modificarse las condiciones naturales. La mayoría de las especies son epífitas, por lo que son las más amenazadas, es posible encontrar un gran número de especies creciendo en un mismo árbol y es difícil encontrar otro tipo de árbol que soporte exactamente las mismas especies; de esta forma son las más amenazadas cuando se destruye su hábitat (Ramírez, 1990).

De hecho la destrucción del hábitat es la amenaza más seria para las epífitas. El número de especies vegetales provenientes de los trópicos que ilegalmente se comercializan, es menor al número destruido, por las operaciones de tala de bosques y selvas.

Es difícil calcular cuantas plantas mueren por cada árbol que cae, considerando que algunos de éstos árboles hospedan cientos de plantas. Los individuos que sobreviven a éstas talas frecuentemente mueren debido a que se ha modificado su hábitat (Ramírez, 1990).



Además de la enorme destrucción de las poblaciones establecidas, en la naturaleza la reproducción de las orquídeas a partir de semilla es lenta y está sujeta a múltiples amenazas.

Por su tamaño y peso las semillas pueden ser desplazadas por el viento o el agua y pueden terminar en cualquier lugar, de estas solo un número reducido encuentra las condiciones adecuadas para germinar y si sobreviven posteriormente requieren muchos años para desarrollar una planta, madurar y llegar a florecer.

Durante los primeros años la planta es particularmente vulnerable a factores físicos del medio y a ser depredada por algún animal, por ejemplo pájaros pequeños, insectos, caracoles, entre otras, si la planta sobrevive a todas esas dificultades la posibilidad de que el polinizador adecuado la encuentre y la polinice durante la época de floración es considerablemente reducida (Ramírez, 1990).

### 1.4.2 Ecológica

Los factores indirectos tienen que ver con la modificación o eliminación del ambiente ecológico necesario para el desarrollo de una determinada comunidad biótica, factores secundarios como la erosión del suelo, modificación del régimen hídrico de la localidad, a veces del clima mismo, ocasionado por los desmontes masivos; la contaminación del aire y del agua, influidos por la quema, la contaminación por pesticidas y otros factores aportados en la protección de los cultivos agrícolas, alteran importantemente las condiciones naturales, que requieren dichas comunidades, causando daños ecológicos muy graves en algunas ocasiones resultan irreversibles (Martínez, 1991).

Algunos factores ambientales influyen en la distribución de las orquídeas, no solo en un contexto geográfico amplio, sino también en contextos más localizados como puede ser por ejemplo un árbol. Las condiciones físicas pueden variar enormemente, aún dentro del mismo árbol hospedero, como son la luz, temperatura, humedad y las características del sustrato (Luna y Barba, 1995).

La luz en el bosque tropical, no aumenta gradualmente del nivel del suelo hacia la copa de los árboles, por el contrario, hay discontinuidades. Aunque la humedad es el principal factor que afecta la distribución de las orquídeas, la luz es muy importante en el micro-sitio de preferencia en un árbol particular (Luna y Barba, 1995).

Los sustratos de las orquídeas epífitas incluyen depósitos de humus y la corteza de árbol. Muchas otras orquídeas crecen sobre sitios rocosos. El humus absorbe agua rápidamente y la retiene por largos periodos, también contiene un suplemento de nutrientes minerales y por lo tanto, ofrece un sitio ideal de adhesión y germinación para las epífitas. Las propiedades de la corteza del árbol que influyen en las epífitas incluyen su relieve, la estructura o porosidad y la composición química. El contenido de agua de la corteza depende de la cantidad y tipo de lluvia, especie de árbol y tasa de evaporación.

### 1.4.3 Comercial

La producción comercial de orquídeas producidas *in vitro* y sembradas en maceta continúa incrementándose influida por cinco factores principales: el incremento de popularidad de orquídeas en Europa, Asia y Estados Unidos; el perfeccionamiento de las técnicas y prácticas de propagación, la aceptación de los cultivos de orquídeas en maceta para los cultivadores; el perfeccionamiento del rendimiento de las plantas, especialmente en orquídeas híbridas; mayor y mejor acceso a las cadenas de abastecimiento.

Estos factores son la base del surgimiento de orquídeas de maceta a una categoría de consumo en los mercados del mundo. Aunque es casi segura la expansión adicional de éstos mercados en la primera década del nuevo milenio (Britt, 1999).

Los principales países importadores son Japón, Estados Unidos, Canadá, Gran Bretaña, Ecuador, Alemania y Venezuela ([http://www.cites.org/common/cop/13/raw\\_rops/Co-Cattleyatrianaei.pdf-microsof](http://www.cites.org/common/cop/13/raw_rops/Co-Cattleyatrianaei.pdf-microsof)). En México, el cultivo de orquídeas es un campo que apenas está desarrollándose. La exportación de plantas en frasco que llevan a cabo una o dos casas cultivadoras no representan un valor comercial importante sin embargo, existe una gran demanda interna y externa por lo que en el futuro la propagación artificial puede convertirse en una actividad económicamente importante, además de que constituye una forma de conservación y rescate de especies en vías de extinción.

## 2. MARCO TEÓRICO.

### 2.1 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS

#### 2.1.1 Estructuras especializadas

La principal característica y el ornamento máspreciado de las orquídeas es la flor, que es una estructura peculiar por su variedad de formas, tamaños y colores (Caneva, 1978).

En particular lo más relevante de la evolución de las orquídeas está en la manifestación de su biología reproductiva. La columna es la estructura resultante de la fusión de los estambres y el pistilo lo cual facilita la polinización siendo el resultado de la co evolución de las flores de las orquídeas y sus polinizadores (Yu y Goh, 2001).

Como plantas monocotiledóneas y parientes cercanas a los lirios, son herbáceas, las nervaduras principales son paralelas y la flor es trómera (tres sépalos, tres pétalos, entre otras).

Las orquídeas sin embargo, se distinguen de otras plantas monocotiledóneas por una combinación de características, algunas de las cuales son únicas entre las plantas con flores como son la morfología de todas y cada una de sus estructuras, por ejemplo de sus flores, de las hojas, de sus raíces y tallos por mencionar algunas (Del Castillo y Ackerman, 1992), en los siguientes apartados presentan la morfología y funcionamiento de éstas estructuras.

##### 2.1.1.1 Morfología floral

La flor de la orquídea posee un verticilo externo formado por tres sépalos y otro interno constituido por tres pétalos alternados con los sépalos. El pétalo dorsal o labelo con frecuencia está sumamente modificado, tanto en forma como en color dándole a la flor una simetría bilateral. Aún cuando el labelo es de origen dorsal, en muchas orquídeas es el pétalo que se encuentra en la posición inferior, ya que el ovario se encuentra hundido en el pedúnculo, donde están insertadas las otras partes de la flor gira 180° mediante resupinación (Del Castillo y Ackerman, 1992).

Internas a los sépalos y pétalos se encuentran las partes fértiles que constituyen un aspecto único en ésta familia. El estilo y los estigmas están fusionados a los estambres formando una estructura común que se conoce como columna. En la mayoría de las orquídeas el número de anteras está reducido, de tres que es el número usual en las monocotiledóneas, a uno. La antera usualmente se encuentra en el ápice de la columna justo encima o debajo del estigma. A diferencia de prácticamente las otras plantas con flor, el polen está agregado en polinios. Entre especies nativas puede haber de dos a ocho polinios en la antera. Los polinios pueden ser granulares, fácilmente separables o pueden ser duros, suaves y cerosos. Presentan estructuras asociadas que permiten que las masas de granos de polen se adhieran a los polinizadores para que éstos los depositen en el estigma de otra flor y efectuar así la polinización. Los polinios con sus estructuras constituyen los polinarios. El viscidio es una almohadilla de tejido pegajoso que se deriva del estigma modificado denominado rostelo. El viscidio sirve para adherir el polinario al cuerpo del polinizador. En algunas orquídeas unas caudículas relativamente débiles y elásticas, adhieren los polinios al viscidio, mientras que en otras especies los adhieren al estípite (Del Castillo y Ackerman, 1992).

El ovario es ínfero y produce numerosos óvulos. Después de la fecundación el ovario se convierte en un fruto, que será una cápsula o una baya. Los óvulos fecundados dan lugar a semillas compuestas por un embrión y la testa. En algunas orquídeas el fruto contiene varios cientos de semillas, pero en algunas de las especies más grandes puede haber varios millones (Del Castillo y Ackerman, 1992).

##### 2.1.1.2 Morfología de las raíces

En las orquídeas las raíces son órganos que pueden estar muy modificados. En las *terrestres* no se diferencian mucho de las raíces de otras monocotiledóneas. En cambio en las *epífitas* encontramos raíces aéreas, que permanecen libres en el aire o se fijan fuertemente a los troncos sobre los cuales viven (no parasitariamente) y extraen del sustrato y el agua de lluvia los nutrientes necesarios para su desarrollo. En general son gruesas, cilíndricas o aplanadas; una característica importante es que las verdaderas raíces aéreas son total o parcialmente clorofiladas y probablemente estén en condiciones de cumplir funciones de asimilación análogas a las que poseen las hojas (Caneva, 1978). Además están cubiertas por una funda esponjosa llamada velamen, característica de orquídeas epífitas presente en algunas terrestres y litófitas.

El velamen facilita la absorción de agua y minerales. En ciertas especies que carecen de hojas la fotosíntesis se lleva a cabo en la raíz (Barba *et al.*, 2002).

La epidermis de la raíz es típicamente pluriestratificada, formada por una vaina apergaminada que consta de células muertas dispuestas de manera compacta y de membrana engrosada. Debajo del velamen hay una exodermis, durante el tiempo seco las células están llenas de aire; cuando llueve quedan llenas de agua. El velamen se interpreta normalmente como tejido absorbente, pero éste punto de vista se discute, debido a que las pruebas con fósforo radioactivo no han podido demostrar el paso del agua desde el velamen al córtex (Espinosa, 1997).

Las raíces pueden originarse en cualquier punto del tallo y crecer en todas direcciones, adhiriéndose a la corteza de los árboles o cualquier otro sustrato sujetando fuertemente en su lugar a la planta (Barba *et al.*, 2002).

#### 2.1.1.3 Morfología de las hojas

Por lo que respecta a las hojas, como en la mayoría de las monocotiledóneas en las orquídeas son simples, paralelinervadas, casi siempre sésiles, alargadas, *generalmente persistentes*. Pueden ser radicales o terminales, solitarias o en número de dos o más. Varían mucho según las especies, en forma y consistencia; su color generalmente es verde (Caneva, 1978).

En algunas especies donde los pseudobulbos están ausentes las hojas se transforman en órganos de almacenamiento de alimento y agua. Debido a la gran cantidad de especies, las hojas de las orquídeas presentan una amplia variedad de formas desde lanceoladas hasta triangular pasando por la forma ovalada (Barba *et al.*, 2002).

#### 2.1.1.4 Morfología del tallo

Las orquídeas se pueden dividir según presenten un tallo o no en caulescentes y acaules; las primeras comprenden también las llamadas orquídeas *pseudobulbosas* en las cuales los tallos normalmente herbáceos o casi frutescentes se transforman en órganos especiales de distinta forma y grosor llamados justamente *pseudobulbos* o falsos bulbos, por su semejanza con los verdaderos bulbos. La función que cumplen es la de almacenar alimento con que sustentar a la planta en tiempo de sequía (Caneva, 1978).

Las orquídeas acaules, no presentan tallo. Muchas orquídeas terrestres están provistas en su parte más baja de tubérculos subterráneos que sirven de depósitos de reserva para la alimentación de los nuevos crecimientos; apenas éstos de han desarrollado, el tubérculo preexistente se torna rugoso y muere; es por eso por lo que se pueden observar en la base de la planta tanto tubérculos hinchados (los nuevos) como arrugados (los viejos) (Barba *et al.*, 2002).

Las orquídeas también pueden dividirse en *monopodiales* y *simpodiales*. Las monopodiales tienen el eje o tallo principal de crecimiento indefinido, cuyo único punto de crecimiento está en el ápice superior de la planta, el cual continúa formando nuevas hojas, provisto en toda su longitud de raíces adventicias, con inflorescencias siempre laterales en la axila de las hojas y opuestas a éstas (por ejemplo las *Vanda*), el tallo monopodial está raramente adaptado a la conservación de agua (Luna y Barba, 1995).

En las orquídeas *simpodiales* se distinguen dos tipos de ejes: un rizoma o tallo rastrero a partir del cual se originan a diversos intervalos tallos carnosos o pseudobulbos de crecimiento definido, esto es, completo a cada fin de estación de la base del cual tras un periodo de reposo, nace un nuevo tallo (Luna y Barba, 1995).

Las orquídeas *simpodiales* pueden tener inflorescencias laterales (como *Dendrobium* y *Oncidium*) y también terminales (como en *Cattleya* y *Cypripedium*) (Caneva, 1978).

#### 2.1.1.5 Simbiosis estricta

En condiciones naturales, las semillas para germinar necesitan asociarse con un hongo simbiote apropiado que le proporcione azúcares simples, los cuales son esenciales para que se lleve a cabo la germinación (Velázquez, 1997).

Las orquídeas en la naturaleza permanecen en etapa de protocormo hasta que son infectadas por un hongo simbiote apropiado. Después de la infección los ápices del protocormo producen las primeras hojas y posteriormente las primeras raíces (Velázquez, 1997).

## 2.2 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS

### 2.2.1 Polinarios

Los granos de polen pueden existir singularmente como mónadas en *Cypripedium*, *Vanillinae* y algunas especies entre los grupos *Diurudeae*, *Neottieae* y *Pogoniinae*.

En las orquídeas más evolucionadas es el polinio entero con miles o millones de granos de polen el que se adhiere a los polinizadores. El número de polinios es comúnmente constante para ciertas especies y varía de 2 a 12.

Como ya se mencionó en los polinios con frecuencia se desarrollan diferentes estructuras como caudículas, el rostelo, el viscidio y el estípite que son importantes para la formación de una unidad llamada polinario. Esta estructura es lo que ha hecho posible los diversos mecanismos de polinización tan precisos y elaborados que existen en la familia de las orquídeas (Luna y Barba, 1995).

Otros aspectos significativos de las orquídeas son: la post-polinización, desarrollo y maduración de óvulos el tiempo sincronizado de micro y mega-gametogénesis para la fertilización y la liberación de miles o millones de embriones en cápsulas maduras. Sin duda, varias de éstas estrategias únicas de orquídeas, contribuyen al éxito de la familia *Orchidaceae* (Yu y Goh, 2001).

### 2.2.2 Polinización

Normalmente se asocia la estructura de una flor con funciones específicas. Como las características de las orquídeas son tan inusuales no es de sorprender que su biología floral también lo sea. Una buena parte de la diversidad morfológica de la flor de las orquídeas puede ser atribuida a los mecanismos de polinización. El proceso de transferir polen de la antera de una flor al estigma de otra puede ser muy elaborado. A los polinizadores los atraen el color, la forma, las fragancias de la flor y las recompensas para ellos tales como el néctar, los aceites esenciales o la combinación de estos factores. Se sabe que las moscas, los escarabajos, las abejas, las avispas, los avispones, las hormigas, los colibríes y las mariposas diurnas y nocturnas son polinizadores de las orquídeas. Cada tipo de polinizador es atraído por distinto tipo de flor. Por ejemplo, los colibríes con frecuencia visitan flores péndulas o colgantes, de color rojo, de forma tubular, que abren durante el día y que carecen de fragancia. Por otro lado, las mariposas nocturnas visitan flores color blanco o verde, que abren de noche y que tienen una fuerte fragancia. Estas relaciones entre el tipo de flor y los polinizadores pueden ser un medio adecuado para restringir la polinización a ciertos grupos de plantas aspecto importante en el proceso de especiación (Del Castillo y Ackerman, 1992).

La flor de la orquídea, está estructurada de tal forma que cuando el polinizador la visita, este hace contacto con el viscidio y al marcharse transporta los polinarios. En la próxima flor que visita, los polinios que se pegaron al cuerpo del polinizador se encuentran en tal posición que entran en contacto y se adhieren al estigma. Cuando el polinizador retrocede roza contra el viscidio y al marcharse lo hace con una nueva carga de polinarios. Por lo general la polinización ocurre entre flores de diferentes plantas, mediante el proceso polinización cruzada o xenogamia. La polinización también ocurre en algunas especies entre flores de la misma planta (geitonogamia) pero adaptaciones morfológicas especiales minimizan ésta posibilidad, como el hecho de que no todas las flores abren al mismo tiempo (Del Castillo y Ackerman, 1992).

Ocasionalmente las flores se pueden autopolinizar (autogamia) descartando, de ésta manera, la necesidad de polinizadores. Cuando esto ocurre al iniciarse el desarrollo de la flor, como ocurre en *Encyclia graviada*, es posible que los botones florales nunca lleguen a abrir (cleistogamia) (Del Castillo y Ackerman, 1992). La mayoría de las flores de las orquídeas son hermafroditas. Solo unas pocas especies del género *Catasetum*, *Cycnoches* y *Mormodes* tienen flores de sexos separados ubicados en inflorescencias diferentes de la misma planta sin embargo, éstas son producidas en tiempos desiguales, por lo cual es imposible la autopolinización (Barba *et al.*, 2002).

### 2.2.3 *Prosthechea vitellina*

*Prosthechea vitellina* es una especie de orquídea silvestre de México con importancia comercial y que fue ubicada en el género *Epidendrum* posteriormente dentro del género *Encyclia* (Rittershausen y Brian 1989). En la actualidad se le ha reubicado en el género *Prosthechea* (Higgins, 1997).

Sinonimias: *Epidendrum vitellinum*.

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

*Epidendrum vitellinum* Lindley, Gen. & Sp. Orch. Pl. 97. 1831, basado en "Pavón," México (Museo Británico, no visto).

*Epidendrum vitellinum* (var.) majus Veitch. Floral Mag. 5: t. 261.1866, basado en Hort. Veitch (no visto).

*Epidendrum vitellinum* (var.) giganteum Warner, Select. Orch. Pl. 3: t. 27. 1877-78, basado en: cult. Broomfield (no visto).

*Epidendrum vitellinum* (var.) autumnale G. Wilson, Orchid World 4: 27. 1913, basado en "Vertiente Pacífico de Centro América" (no visto).

*Epidendrum vitellinum* Lindl., Gen. Sp. Orchid. Pl. 97.1831. (Ramírez, 1990)

*Prosthechea vitellina* (Lindl.) W. E. Higgins, comb. nov. (1997).

Clasificación taxonómica: (Ramírez, 1990)

Reino: Vegetal.

División: Embryophyta Siphonogama.

Subdivisión II: Angiospermae.

Clase : Monocotyledonae DC.

Orden: Microspermae (Bentham y Hooker).

Familia: Orchidaceae Lindl.

Subfamilia: Epidendroideae.

Tribu: Epidendreae.

Subtribu: Laeliinae.

Género: *Prosthechea* (Lindl.)

Especie: *Prosthechea vitellina* (Lindl.)

## 2.2.4 Distribución de *Prosthechea vitellina*

*Prosthechea vitellina* habita en México y Centroamérica. El color rojo brillante de sus flores que la distingue entre las orquídeas, hace a ésta planta especialmente deseable como planta ornamental (Rittershausen y Brian, 1989).



Fig 1. DISTRIBUCIÓN DE *Prosthechea vitellina* (Hágsater y Salazar, 1990).

En México se encuentra distribuida en varios lugares como son Sierra de Veracruz, Puebla, Oaxaca y Chiapas (Fig 1) además en Centroamérica (Guatemala y El Salvador). Se localiza a una Altitud de 1500 a 2600 m en bosques de pino y encino, de encino, bosques de niebla, con suelos de muy poca maleza, achaparrado de pedregal de lava o sea volcánicos (Dressler y Pollard, 1974).

Su nombre popular en Veracruz es “miguelitos”, “manuelitos” y “caballeros”. Crece en lugares secos por lo que la hace ideal para cultivo en interiores (Rittershausen, 1989).

*Prosthechea vitellina* se encuentra en centro del Estado de Veracruz, se presentan en zonas entre los 1400 y los 2600 m de altitud, en las que existe una gran abundancia de coníferas; algunas en éstas zonas tienen suelos de lava volcánica negra (Hágsater y Salazar, 1990).

*Prosthechea vitellina* crece en la zona fría de las nieblas constantes desde poco antes del “Cofre de Perote” pasando por las laderas del “Pico de Orizaba” hasta el estado de Chiapas y la República de Guatemala, regiones éstas dos últimas en que es bastante más escasa y contrariamente a lo que sucede con otras orquídeas de un tamaño y colorido inferior, mientras que las plantas más fuertes y con flores relativamente grandes (var. *majus*) crecen las zonas húmedas y frescas de la vertientes orientales del “Pico de Orizaba” (Pontes, 1972).

### 2.2.5 Descripción de *Prosthechea vitellina*.

Planta herbácea epífita, de tamaño mediano, de hasta 40 cm de alto (Fig 2).

Epoca de floración: otoño, de abril a septiembre, o probablemente todo el año (Dressler y Pollard, 1974).

**Raíces:** blanquecinas, de 1-3 mm de grosor.

**Pseudobulbos:** agrupados, de forma cónico-ovoides ligeramente comprimidos, verdes, glaucos cuando jóvenes, frecuentemente negruzcos con el tiempo, de 2 a 6 cm de largo x 1-4 cm de ancho.

**Hojas:** presenta de una a tres, agrupadas en el ápice del pseudobulbo, subcoriáceas, angostamente elípticas a ablancoadas, obtusas con la vena media prominente en el envés, 7 a 25 cm de largo x 1-3.6 cm de ancho, carnosas y de forma alargada (Mc. Kenzie 1988, Hágsater y Salazar, 1990).

**Inflorescencia:** la delicada inflorescencia sencilla o poco ramificada, usualmente crece erecta de aproximadamente 30 a 45 cm (Fig 3). dependiendo del número de flores terminal, racemosa en ocasiones ramificada con 4, 20 o hasta 30 flores simultáneas; pedúnculo terete envuelto en la base por una bráctea espatácea, escariosa, conduplicada, triangular-lanceolada, aguda, 10-60 mm de largo y más arriba con varias brácteas envainantes, herbáceas, ampliamente ovadas a triangular-ovadas, obtusas a agudas, de 6-10 mm de largo (Mc Kenzie, 1988).

**Flores:** el largo de las flores es de 3 a 4 cm. aproximadamente con una extensión de forma elíptica que abarca desde los sépalos y los pétalos, con un matiz que va del anaranjado al escarlata oscuro. Las flores son vistosas, algo carnosas, muy abiertas, casi planas, resupinadas, inodoras, los sépalos y pétalos de color anaranjado a rojo-naranja, el labelo y la columna de color amarillo o anaranjado muy pálido, la antera rojo-naranja. El pequeño labio como péndulo en forma de lengua, unido a la columna solo en la base, es amarillo yema de huevo (*vitellinum*) (Mc Kenzie, 1988), (Fig 3).

**Ovario:** delgado, recto o frecuentemente geniculado, abruptamente engrosado en el tercio apical, de 10 a 25 mm de largo, de 3 mm de grosor en el ápice.

**Sépalos:** elípticos angostos y lanceolados, agudos, con márgenes ligeramente revolutos; de 1.5 a 2 cm de longitud, de 0.3 a 0.8 cm de ancho, el dorsal ligeramente quillado, los laterales ligeramente oblicuos, prominentemente quillados dorsalmente sobre todo cerca ápice, de 14-30 x 3-10 mm.

**Pétalos:** ampliamente elípticos, agudos, el ápice recurvado, de 13-28 x 6-15mm o 1.7 a 2.3 cm de longitud, de 0.6 a 1.1 cm de ancho.

**Labelo:** entero cortamente unido a la base de la columna, oblongo lanceolado-elíptico, la mitad basal con un callo carnoso, sulcado, elevado justo frente al ápice de la columna, prolongado delante en tres quillas cortas, la mitad apical convexa, con márgenes algo recurvados y ápice obtuso a agudo, de 11.5-20 x 0.3-6 mm.

**Columna:** recta semiterete, con un nectario ligeramente excavado en la superficie ventral en la zona unida con el labelo (gota de néctar evidente en fresco), el ápice terminado en tres dientes, los laterales oblicuamente triangulares, agudos, el diente medio subcuadrado, truncado, ocultando parcialmente la antera y una pequeña lígula trapezoide; de 6-10 mm de largo y de 4 mm de ancho en el ápice.

**Antera:** 4-locular de 1.5 x 2.5 mm.

**Polinario:** compuesto por 4 polinios obovoides, lateralmente comprimidos, amarillo-café, unidos a caudículas granuladas.

**Rostelo:** pequeño semicircular, con una secreción viscosa y adhesiva a la superficie ventral.

**Cavidad estigmática:** en forma de “V”, cóncava.

**Cápsula:** elipsoide, 3-angulada, de 30 x 15 mm  
(Hágsater y Salazar, 1990).

En la época de floración de la *Prosthechea vitellina*, su colorido escarlata brillante la hace sumamente conspicua; aún cuando la niebla esté más o menos espesa las flores resaltan sobre las ramas horizontales de los encinos, especialmente de aquellas que tienen poco follaje, no se le ha visto crecer sobre los pinos que tienen follaje denso o sobre otra clase de árboles, estando siempre asociadas con líquenes que casi la cubren y que solo permiten ver las dos o tres hojas verde oscuro y la parte superior del pseudobulbo piriforme y ligeramente aplanado que presenta la planta; así mismo, se pueden ver con frecuencia plantas perfectamente sanas con la superficie cubierta de una capa delgada casi negra posiblemente formada por criptógamas microscópicas. Bajo la capa de líquenes las raíces aparecen delgadas y blancas extendiéndose hasta más de 30 cm. en torno a la planta rodeando la rama.

La planta crece en posición vertical localizada en la parte de arriba de las ramas horizontales, en especial cerca o entre las masas mayores de líquen (Pontes, 1972).

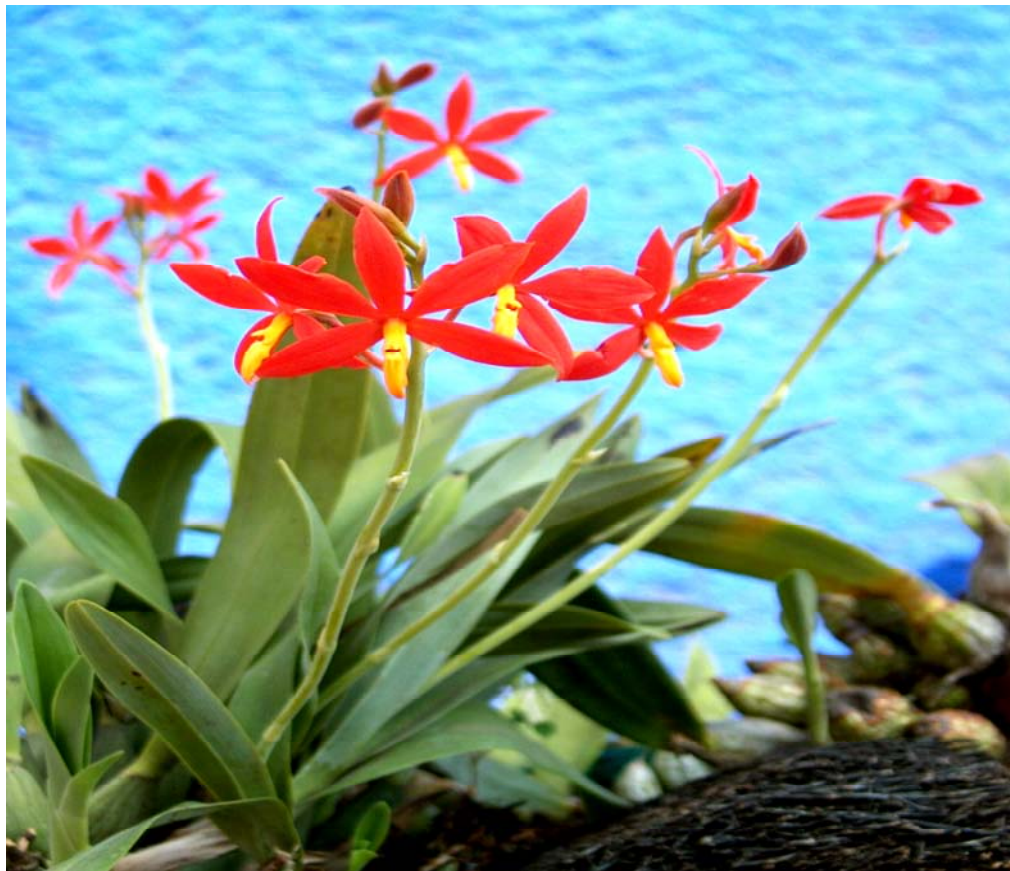


Fig 2. *Prosthechea vitellina*  
Citado por (Hágsater y Salazar, 1990).

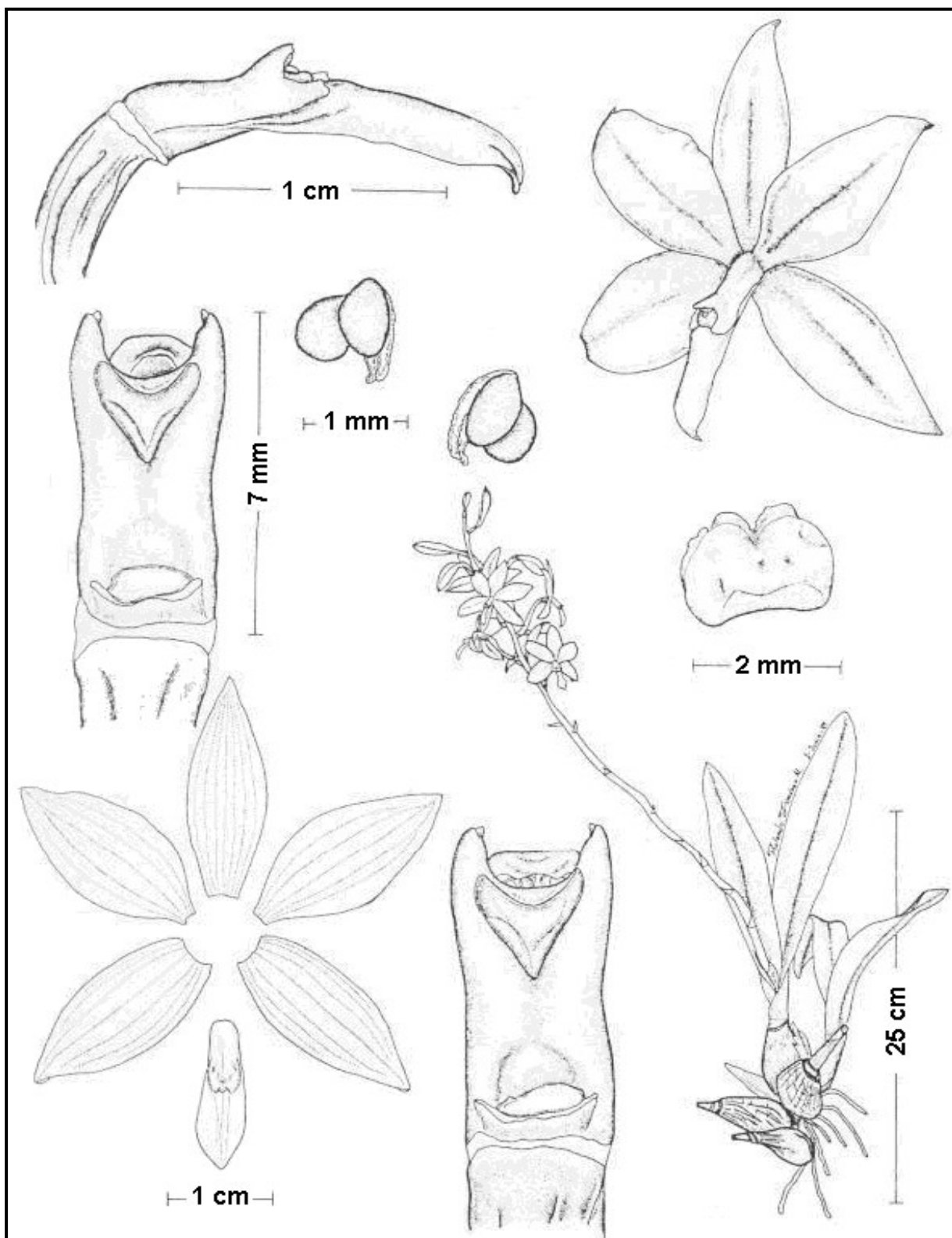


Fig 3. MORFOLOGÍA DE *Prosthechea vitellina*  
(Hágsater y Salazar, 1990).

*Prosthechea vitellina*



## 2.3 SEMILLAS DE ORQUÍDEA

Las semillas de las orquídeas miden entre 0.05 (*Anaectochilus imitans*) y 6.0 mm de largo (*Epidendrum secundum*) por 0.01 (tipo *Gastrodia*) a 0.93 mm de ancho (*Galeola nudifolia*) (Barba, *et al.*, 2002). Y consisten en un embrión indiferenciado incluido dentro de una testa transparente. No hay endospermo ni cotiledones sino una masa de células con escasa diferenciación. Algunas veces el embrión falta y la semilla es infértil (Arditti, 1977).

Las células de la cubierta están muertas, vacías y generalmente son transparentes, su pared puede ser simple, diversamente ornamentada y raramente gruesas (Withner y Kieger, 1985).

Es limitado el número de especies estudiadas, por las características de las semillas de las orquídeas durante el almacenaje son clasificadas como “ortodoxas” en el sentido de que la longevidad es mejorada con reducción del contenido de humedad alrededor del 20% al 5% y disminuyendo la temperatura de almacenaje de 62°C a 0°C (Pritchard y Seaton, 1993).

### 2.3.1 Viabilidad

Los primeros reportes para el óptimo almacenaje y conservación de la viabilidad de semillas de orquídeas los hizo Jancke 1915 quién recomendó mantener las semillas de cápsulas dehiscentes en una cámara a temperatura baja y en oscuridad, en pequeños sobres de papel, o tubos de ensayo tapados. Las semillas almacenadas bajo dichas condiciones, pudieron germinar normalmente un año después, Jancke lo atribuyó a las condiciones frías de la cámara, posteriormente se confirmó la validez de su información en numerosas pruebas (Pritchard y Seaton, 1993).

*Cattleya trianae* tuvo un 40% de viabilidad y una alta germinación, después de tres años en condiciones anhidras a baja temperatura, siendo algo inusual para semillas de cierto tiempo de almacenamiento (Knudson, 1924; 1934, Pritchard y Seaton, 1993).

Las semillas de especies de *Brassolaeliocattleya* y *Dendrobium*, perdieron su viabilidad completamente después de dos o tres meses de almacenamiento y refrigeración (Kano, 1965 y Pritchard y Seaton, 1993).

En pruebas con semillas de ocho orquídeas terrestres europeas, tuvieron entre 2 y 22% de viabilidad en un lapso de 2 a 52 semanas de almacenamiento en refrigeración (Waes, 1984; Ronse, 1989; y Pritchard y Seaton, 1993).

Pritchard en 1985 reporta que el incremento de la longevidad fue registrada con la reducción de la temperatura (de 2° a 6°C) resultando una pérdida de viabilidad relativamente pequeña, conservando el 50-70% de viabilidad en las semillas de *Eulophia alta* y *Dactylorhiza maculata*, después de 2 a 6 meses de almacenaje (Dijk, 1987; Pritchard y Seaton, 1993).

En semillas de *Cattleya aurantiaca* que se almacenaron a 5°C con un contenido de humedad de 6.5 al 10.4% durante 6 años perdieron del 33 al 37% de viabilidad (Pritchard, 1985, Seaton y Hailes, 1989).

Knudson en 1934 preservó la viabilidad de las semillas de orquídeas por largo tiempo esto dependió de la combinación de bajas temperaturas y condiciones secas. Esto se hizo evidente casi 60 años después y fue el principio para preservar cierta viabilidad en semillas de *Cattleya* 8 años después de almacenadas (Pritchard y Seaton, 1993).

Sin embargo, se obtuvieron un amplio número de datos de numerosas pruebas que demostraron el potencial que significa el almacenamiento adecuado de semillas de orquídeas, esto fue el inicio de los estudios pioneros que Knudson efectuó con híbridos de *Cattleya* y algunas otras especies. Estas investigaciones han demostrado que hay diferentes variaciones en la viabilidad de distintas especies, después de 22 años de almacenaje a 8°C con cloruro de calcio anhidro (Knudson 1940; 1953; Pritchard y Seaton, 1993).

Para semillas de *Dendrobium phalaenopsis* y *Phalaenopsis amabilis*, se registró la pérdida de cerca del 30% de viabilidad en 20 días Limartha 1975 (citado por Pritchard y Seaton, 1993).

Seaton en 1985 comprobó que semillas de *Cattleya aurantiaca* perdieron su viabilidad después un año de almacenamiento con el 2.2 a 5.6% de humedad, a 20°C (Pritchard y Seaton, 1993).

La longevidad de semillas secas de *Dactylorhiza fuchsii* almacenadas a una temperatura de 62°C fue limitada a pocos días (Pritchard, 1985 y Pritchard y Seaton, 1993).

Vertucci, 1989 menciona que las semillas ricas en lípidos de algunas especies presentan una reducción en el índice de germinación (porcentaje de germinación x longitud radical) cuando son congeladas rápidamente en nitrógeno líquido a temperaturas de 196°C y ésta respuesta ha sido atribuida a una transición a cristales o vitrificación de los componentes lipídicos a temperaturas de alrededor de -90°C (Pritchard y Seaton, 1993).

Sin embargo, los efectos dañinos del almacenamiento de semillas secas de *C. aurantiaca* a  $-18^{\circ}\text{C}$  no pueden ser atribuidos a la vitrificación de lípidos cuando la exposición a la temperatura fue insuficientemente baja. Entonces, cuando se presenta una reducción de la viabilidad en las semillas, ésta puede ser asociada con la ocurrencia de los lípidos en un estado de conformación específico: tomando lugar transiciones sobre un rango de temperatura de  $-35$  a  $-5^{\circ}\text{C}$  durante el calentamiento. Las semillas almacenadas a una temperatura pocos grados por encima de que éstos lípidos han completado sus cambios de estado de conformación, son las que presentan la mejor viabilidad ( $5^{\circ}\text{C} > 20^{\circ}\text{C} > -18^{\circ}\text{C}$ ). Concluyen Seaton y Hailes (1989) que los mecanismos por los que el estado de conformación de los cuerpos lipídicos posiblemente influyan en la viabilidad de las semillas de orquídeas aún se desconocen (Pritchard y Seaton, 1993).

Resultados en la literatura acerca del almacenamiento de semillas de especies tropicales a  $-10^{\circ}\text{C}$  sugieren que la conservación de semillas por un largo periodo bajo condiciones del banco de semillas convencional (alrededor de  $-20^{\circ}\text{C}$  y 5% de contenido de humedad) es problemática (Pritchard y Seaton, 1993).

Las semillas secas a dos temperaturas de *Dactylorhiza fuschii* y *Orchis morio*, germinaron después de 6 y 7 años de almacenadas a temperaturas bajo cero.

Las semillas de *Cattleya luegeae* almacenadas por Burke y Northen 1948 durante dos semanas con aire seco a  $-23^{\circ}\text{C}$  germinaron sin problema por el tratamiento (Pritchard y Seaton, 1993).

Koopowitz y Ward en 1984 almacenaron por 5 semanas a  $-40^{\circ}\text{C}$  semillas de *Encyclia vitellinum* y no disminuyeron los resultados de porcentaje germinación (Koopowitz y Ward, 1984 y Pritchard y Seaton, 1993).

El sistema de almacenamiento de Arditti 1967 con semillas de *Bletia urbana* a temperaturas de  $4-8^{\circ}\text{C}$  por más de 6 años presentó un alto porcentaje de germinación asimbiótica, esto sirvió de modelo para poner a prueba otras especies logrando con éste sistema que las semillas de orquídeas de algunas especies se mantuvieron viables por 18 años, también indica que algunas especies pueden perder su viabilidad en unas cuantas semanas (Martínez, 1991).

Se continúan haciendo investigaciones para saber las condiciones ideales de almacenamiento de semillas de orquídea Koopowitz y Thornhill en 1984, demostraron que las semillas de *Prosthechea vitellina* almacenadas de  $-40$  a  $-20^{\circ}\text{C}$  presentaron una viabilidad de 95%, a pesar de haber sido almacenadas por 10 años, resultados recientes indican que los experimentos de éste lote de semillas continúan teniendo resultados con un buen rendimiento (Hicks, 2000).

### 2.3.2 El embrión en las orquídeas

El embrión en las orquídeas es una masa indiferenciada de células. Pero en la ontogenia de ésta masa de células, las diferencias consisten en los conceptos de estado relativamente primitivo y estado avanzado de las especies correspondientes. Los dos principales tipos de embrión en las orquídeas son: sin suspensor y con suspensor. Los embriones sin suspensor son considerados primitivos y se encuentra en *Cypripedium* y en otros géneros como *Spiranthes*, *Listera*, *Neottia*, etc. de la tribu *Neottieae*.

Entre los embriones con suspensor Swamy en 1949 (citado por Abraham y Vatsala, 1981) quién reconoció cinco tipos de suspensor menciona que el primero está formado por una sola célula como son por ej. *Paphiopedilum*, *Epipactis*, *Goodyera* y *Vanilla*, el segundo tipo de suspensor es el haustorial y es confinado exclusivamente a la familia Orchidaceae. Los otros tres tipos se encuentran en Epidendreae.

La embriogénesis es un proceso relativamente corto desde la polinización hasta la dehiscencia del ovario, comparado con otros fenómenos concurrentes en la formación del fruto, ésta última es en promedio de aproximadamente dos semanas.

Cuando la cápsula está lista para la dehiscencia, el tegumento interno del óvulo se degenera parcialmente y el tegumento externo se degenera totalmente. En la mayoría de las semillas de orquídeas la cutícula de la epidermis del tegumento interior del óvulo persiste ésta al parecer, tiene el efecto de impedir la hidratación de la semilla y de éste modo impedir su germinación. El embrión puede estar limitado y en contacto con una cubierta protectora o puede estar más o menos aislado en el centro de ésta de acuerdo al desenvolvimiento del tegumento externo en el curso de la embriogénesis (Withner y Kieger, 1985).

Los embriones de orquídeas son pequeños cuerpos elipsoidales cuando maduran (están constituidos por 4 o 5 células) pueden medir entre 0.058 y 0.1 mm de ancho por 0.150 y 0.300 mm de largo, ocupan sólo una porción muy pequeña del espacio interno de la semilla el resto está ocupado por aire (Barba, *et al.*, 2002).

Ante la ausencia de endospermo, al suspensor se le atribuye el papel de la nutrición, que cuando no está presente es atribuida al contacto del saco embrionario con el embrión; el embrión está formado por voluminosas células que almacenan sustancias de reserva, cubierto por la testa por lo anterior, al embrión de las semillas de orquídeas se le considera en un estadio rudimentario (Harrison y Arditti, 1970; Martínez, 1991).

Las células del embrión varían de tamaño dependiendo de su localización, las de la punta meristemática son pequeñas, generalmente miden de 8–10  $\mu\text{m}$  de diámetro, las células más grandes conforman el resto del embrión y se hace referencia a ellas como células basales. A pesar de que Harrison y Arditti, 1978; Arditti, *et al.*, 1981; Arditti, 1992, mencionan que las semillas no tienen tejidos de reserva para nutrir al embrión durante la germinación, y todas las células del embrión contienen reservas alimenticias (Martínez, 1991).

Análisis de semillas de *Cymbidium* han mostrado que contienen 1% de azúcar, 32% de grasa y ningún almidón. Aunque hay reservas de alimento en el embrión las semillas que germinan no parecen ser capaces de utilizarlas (Harrison y Arditti, 1970).

Los lípidos constituyen una gran porción de material de reserva y están presentes como cuerpos lipídicos. También se pueden observar los cuerpos proteínicos pero se restringen a células situadas en dos terceras partes del embrión es decir, en el área micropilar, el citoplasma es denso por la acumulación de las proteínas y además se encuentran numerosos glóbulos de aceite. El embrión está unido por medio de varias fibras celulares a la testa. Está rodeado por un gran espacio de aire interior, lo cual ocasiona que la semilla tenga la capacidad de flotar, tanto en el aire como en el agua (Abraham y Vatsala, 1981) por lo que están bien adaptadas a la diseminación por el viento y el agua (Velázquez, 1997).

Morfológicamente las semillas de orquídeas son, ovoides y pesan menos de 15 microgramos. Los frutos producen un gran número de semillas, fluctúan de varios cientos hasta miles de semillas por cápsula dependiendo de la especie (Barba, *et al.*, 2002).

## 2.4 GERMINACIÓN

### 2.4.1 Germinación de las orquídeas

El proceso de germinación, es similar entre la mayoría de las orquídeas (Arditti, 1992). El crecimiento del embrión solamente ocurre después de que la semilla ha sido infectada por un hongo micorrícico simbiote. El proceso de germinación se inicia con la absorción de agua por el embrión, éste se hincha y se ensancha.

Sus células se alargan y forman vacuolas por lo que el embrión asume una forma esférica (etapa de esférula pequeña). Posteriormente éstas células hacen presión constante con la testa la cual se estira y finalmente se rompe. Las células del embrión empiezan a sintetizar clorofila, especialmente en la región micropilar, también se utiliza el material alimenticio de la semilla y se inicia el crecimiento, se absorbe la materia orgánica del sustrato y se diferencian los órganos. Los pelos absorbentes se desarrollan a partir de la epidermis, a su vez se desarrolla una pequeña papila hacia la base. Conforme ésta estructura aumenta en tamaño se forma una masa globular de células (protocormo) con una depresión en la superficie superior.

Algunas de sus células epidérmicas del protocormo comienzan a alargarse y sobresalen protuberancias que originarán rizoides. El protocormo continúa aumentando en tamaño, antes de la emergencia de la primera hoja de su ápice y posteriormente se desarrolla la primera raíz. Los protocormos de muchas especies epífitas contienen clorofila. Durante el desarrollo del protocormo, al continuar la germinación nuevos tipos de células aparecen. Células internas más pequeñas que las del córtex, se desarrollan y forman una capa entre la epidermis y éste, al desarrollarse completamente. Externamente, los rizoides se desarrollan a partir de la epidermis y pueden reconocerse como células alargadas individuales y después como estructuras multicelulares más complejas (Velázquez, 1997).

#### 2.4.1.1 El cultivo *in vitro* de semillas

Bernard en 1903 realizó estudios para germinar semillas de orquídea. Tanto él como Burgeff, 1909 concluyeron que la infección por el hongo era necesaria para germinar semillas en el laboratorio, (citados por Larson, 1988). Knudson en (1920) mostró que el hongo convertía el almidón en azúcar y que las semillas utilizaban éste azúcar para germinar. Knudson sustituyó el hongo por azúcar y obtuvo un crecimiento excelente sin necesidad del hongo (Larson, 1988).

El cultivo *in vitro* de orquídeas recibió un fuerte impulso con Knudson 1922 quién estableció un medio de cultivo propicio para obtener la germinación asimbiótica de las semillas (Ramírez, 1990). Desde principio de siglo XX, los métodos de propagación de orquídeas por semilla han cambiado considerablemente. El avance más revolucionario fue la introducción de la germinación asimbiótica establecida por Knudson en 1922 (Harrison y Arditti, 1970).

Actualmente los métodos artificiales de germinación de orquídeas se separan en 1) Germinación simbiótica y 2) Germinación asimbiótica.

Hasta 1900 el cultivo de semillas era una práctica común entre los primeros cultivadores al sembrar semillas en la superficie del material de soporte de otra planta de orquídea, antes de sembrarlas se cortaba todo el musgo posible y se mojaba la planta con agua de lluvia algunas horas antes. La semilla se extendía sobre la superficie y se tenía cuidado de que no se deshidratara la planta en ningún momento. El método era moderadamente exitoso y se usaba en la mayoría de las colecciones de aficionados de la época (Harrison y Arditti, 1970).

D. G. Downie en 1940 puso a germinar semillas de *Goodyera rapens* en medio de cultivo "Pfeffer" con la adición del hongo micorrízico obteniendo buenos resultados que mejoraron al adicionar azúcar, sin embargo, no obtuvo respuesta en ausencia de la micorriza (Arditti, 1984). Se sabe que muchos hongos simbióticos endofíticos, están en el suelo y son capaces de existir independientemente de las orquídeas (Downie, 1943 y Harvais y Raitsakas, 1974).

Los trabajos de Smith 1966 y 1967 apoyan firmemente la existencia de los hongos simbióticos y sugieren que las orquídeas tienen beneficios de la relación endofítica. Esta actividad es realizada por el hongo huésped y es una interacción compleja, o sea una asociación simbiótica o patógena, ésta asemejándose posiblemente a un buen hongo simbiótico que puede producir metabolitos en un medio de cultivo axénico, que puede ser benéfico para la orquídea compatible con el huésped (Harvais y Raitsakas, 1974).

El término micorriza, fue utilizado por primera vez por Frank en 1885 (Plenchette, 1982), para designar la asociación de hifas fúngicas con los órganos subterráneos de las plantas superiores. Etimológicamente, la palabra se forma del término griego "myces" (hongo) y del vocablo latino "rhiza" (raíz). Esta asociación de un hongo y una raíz da lugar a un nuevo órgano que tiene su morfología propia y su fisiología particular, donde las dos partes obtienen un beneficio mutuo y su asociación constituye una simbiosis (Espinosa, 1997).

Jaen en 1989 (Espinosa, 1997) llamó al micelio del hongo combinado con las raíces micotrofia y que forman una estructura compuesta especial, denominada micorriza.

Han existido muchas controversias sobre la especificidad de la relación orquídea-hongo. Algunos autores específicamente (Knudson 1922; Curtis 1936 y Dressler, 1981a) sostuvieron que esa relación no es específica y que la simbiosis puede formarse con diferentes hongos, así mismo afirmaron que la simbiosis no es necesaria para el crecimiento de las orquídeas.

Luna y Barba en 1995 confirman que la vida para las orquídeas sean epífitas o terrestres, es de un balance precario y al no contener sus semillas suficientes reservas nutritivas, depende del establecimiento de la relación simbiótica con un hongo al menos durante las etapas iniciales de germinación y desarrollo. El azúcar y otros compuestos orgánicos, que pueden ser usados como una fuente de energía, deben ser suplementados por éste hongo, también ciertos minerales son transmitidos por ellos. En ausencia del hongo, las semillas germinan y crecen bien por unas semanas pero posteriormente languidecen y mueren, a menos que sus raíces encuentren un hongo apropiado.

Estos hongos obtienen compuestos orgánicos a partir de materia orgánica y suministran minerales, agua y azúcares sencillos aprovechables por las orquídeas. El hongo ayuda a mantener un rango favorable de acidéz para las semillas y permite el desarrollo de plántulas con un suministro principalmente de carbohidratos (Velázquez, 1997).

Algunos autores consideran a la asociación de las orquídeas con sus endofitos como una simbiosis en la frontera de la enfermedad Plenchette en 1982 (Espinosa, 1997) menciona que el tipo de micorriza que presentan las orquídeas son endomicorrizas. El grupo simbiote fúngico es el de Basidiomicetos (*Rhizoctonia*, *Tulasnella*, *Thanathephorus* y *Ceratobasidium*) y las estructuras que presentan son ovillos o pelotones de hifas de células que permiten o mejoran el desarrollo de la plántula, el hongo proporciona el carbono total o parcialmente y proporciona protección contra enfermedades. La interrelación entre la orquídea y el hongo endosimbiótico es compleja y está en un estado de balance. En general los hongos pueden ser aislados de plantas adultas de orquídeas y ser utilizados inoculándose dentro de medios de cultivo de semillas para lograr una germinación simbiótica inducida (Espinosa, 1997).

El contacto con el hongo micorrízico provoca la infección de las semillas, normalmente ésta ocurre a través de las células del suspensor, el contacto inicial entre el hongo simbiote y las semillas se ha observado que es al azar ya que hasta la fecha no hay evidencias de un exudado o sustancia similar que sea producida por las semillas de orquídeas para que el hongo se adhiera. En la secuencia de la germinación, las hifas del hongo primero penetran en la cubierta de la semilla por medio de los microporos de la testa. Una vez dentro de la testa las hifas son atraídas a la región del suspensor, donde una o más hifas penetran en las paredes de las células. Estas hifas se expanden a través de las células del suspensor y penetran las paredes adyacentes de las células corticales. Posterior a la infección del córtex, las hifas fúngicas se ramifican por todo el citoplasma y forman haustorios.

La presencia de haustorios en un embrión es la primera indicación de una compatibilidad hongo/orquídea y que la germinación ha comenzado. Inmediatamente después de la formación de los haustorios en las células corticales, las células meristemáticas empiezan a dividirse y crecer (Markovina y McGee 2000).

En la etapa inicial heterótrofa de los protocormos de orquídeas, el desarrollo y la traslocación de carbohidratos en dirección a la planta han sido demostrados en varias especies de orquídeas simbióticas contrastando los tipos de hongos micorrízicos (Smith, 1966 y 1967; Purves y Hardley 1975; Hardley, 1984 y Dijk y Eck 1995).

En plantas autótrofas adultas el transporte de compuestos de carbono puede cesar (Alexander y Hardley 1985). La traslocación de carbohidratos en dirección opuesta, como la mayor parte de las asociaciones micorrízicas nunca han sido demostradas sin equivocarse en micorrizas de orquídeas, (Hardley y Purves 1974; Alexander y Hardley, 1985 y Dijk y Eck 1995).

Existen investigaciones con diversas especies de orquídeas donde se han germinado semillas con la utilización de algunas especies de hongos y sin ellos, estudios que son el fundamento que ha generado conocimiento acerca de la germinación y desarrollo de las orquídeas, como se presenta a continuación.

El efecto de la infección micorrícica en presencia de nitrógeno mineral fue estudiado en las especies *Orchis morio* L., *Dactylorhiza praetermissa* ((Druce) var *junialis* (Vermln.) Sengh., *Dactylorhiza majalis* (Reichb.) Hunt y Summerh., y *Dactylorhiza incarnata* (L.) utilizando como simbiontes micorrízicos dos especies de *Ceratorhiza* sp y dos más de *Epulorhiza repens*. En presencia de ambos tipos de endófito se favoreció el crecimiento de las orquídeas en relativamente bajos niveles de nitrógeno aprovechable en medio de cultivo.

Sin embargo en la prueba donde se utilizó *Ceratorhiza* decreció la tolerancia de los protocormos al nitrógeno asociado y tuvieron efectos negativos en el crecimiento y la sobrevivencia en *Dactylorhiza majalis* y *Dactylorhiza incarnata*, así como altas concentraciones de nitrato de amonio. En el caso de la simbiosis con *Epulorhiza* no ocurrió lo mismo ya que las diferencias fueron observadas en la medida en que dicho hongo estimuló el crecimiento de las plántulas de orquídeas. En conclusión determinaron que los aislamientos de *Ceratorhiza* fueron incompatibles con *Orchis morio*, mientras los de *Epulorhiza* fueron generalmente menos eficientes para *Dactylorhiza* sp (Dijk y Eck, 1995).

En otro estudio se describió el inicio del proceso de desarrollo de las orquídeas, donde después de la infección micorrícica un primordio foliar emerge a partir de la depresión de la superficie superior, conforme el protocormo continúa su desarrollo. Una segunda y tercera hoja se forman y después se inicia el desarrollo de la o las primeras raíces, se forma clorofila en las hojas o en otros órganos fotosintéticos, la planta crece y por último madura. El tiempo requerido para cada uno de éstos eventos varía según la especie (Velázquez, 1997).

Otro ejemplo es la descripción de la germinación *in vitro* y el inicio del desarrollo de semillas de *Encyclia tampensis* una especie de orquídea epífita comercialmente explotada de Florida y las Bahamas Luer en 1972 (citado por Zettler, *et al.*, 1999) donde se confirmó la participación del hongo micorrícico y la simbiosis hongo-orquídea consistió en la observación de pelotones en las células corticales de la base de las plántulas. Dos grupos de semillas de *Encyclia tampensis*, se pusieron a prueba en una fueron inoculadas con un hongo micorrícico aislado de la orquídea epífita, *Epidendrum conopseum* Rose & Britton, en la otra no se inocularon. El 99.6% las semillas inoculadas con el hongo germinaron en 21 días, mientras que las semillas sembradas en ausencia del hongo suspendieron su germinación. Aproximadamente el 2% de las plántulas presentaron sus primeras hojas después de 13 semanas de incubación (Zettler, *et al.*, 1999).

Velázquez en 1997, menciona que cuando una semilla de orquídea germina, y antes de que todas las funciones metabólicas inicien completamente, el crecimiento y/o la diferenciación de la planta puede estar limitada verdaderamente por la falta o carencia de un componente en particular, los experimentos han dado indicios del papel que tienen los carbohidratos en la fisiología de las orquídeas. Los primeros estadios de germinación, corresponden a la degradación de los materiales de reserva de naturaleza lipídica del embrión y a la aparición de almidón dentro de las células basales del embrión, se efectúan espontáneamente, las semillas pasan a la etapa de protocormo, que es un estadio intermediario entre el pro-embrión y la plántula.

Knudson en 1922 (citado por Markovina y McGee, 2000) comparó los resultados de la germinación simbiótica y asimbiótica *in vitro* y el desarrollo de plántulas de especies de *Sarcochilus* e híbridas. Se aislaron pelotones de cuatro hongos encontrados en las raíces de *Sarcochilus olivaceus* y *Sarcochilus falcatus*, y se inocularon las semillas en un medio comercial, resultando que en tres cultivos las semillas germinaron en una proporción similar. En el cuarto cultivo las hifas del hongo aislado cubrieron las semillas, un hongo identificado como *Ceratorhiza* sp estimuló el crecimiento de las plántulas durante trece semanas después de la germinación. Posteriormente las plántulas de un año de germinadas presentaron la formación de micorriza simbióticamente con un híbrido de *Sarcochilus*, mismo que estimuló un mayor crecimiento en comparación con las plantas sembradas asimbióticamente, nuevamente se comprueba que el hongo estimuló el crecimiento de

hojas y raíces significativamente, más que en las que fueron sembradas asimbióticamente. Los autores sugieren que las técnicas simbióticas tienen gran importancia en la producción masiva de plantas. La inclusión del hongo en el cultivo de orquídeas tiene implicaciones para la conservación. El simbionte natural es necesario para la supervivencia de las orquídeas silvestres, y la especificidad existente entre la orquídea y el hongo (Warcup, 1971; Perkins, *et al.*, 1995 y Markovina y McGee 2000). Para germinar las semillas deberán llegar a un sustrato con condiciones óptimas de humedad, acidez, luz y el hongo micorrízico adecuado (Barba, *et al.*, 2002).

#### 2.4.2 Germinación asimbiótica

Harrison en 1973 probó que los embriones cultivados en medio sin azúcar mantienen un estado de protocormo y son incapaces de producir hojas y raíces (Leroux, *et al.*, 1995).

La germinación asimbiótica de semillas de *Bletia urbana*, descrita por Chávez (1980) es un ejemplo de propagación en la que se logró la germinación y desarrollo *in vitro* de esta especie endémica de México que se encuentra en peligro de extinción.

En pocos trabajos se reporta la absorción de los componentes del medio de cultivo utilizados por las orquídeas *in vitro*, la elección de componentes inorgánicos y orgánicos se ha basado principalmente en la experiencia de análisis científicos. El estudio efectuado con las orquídeas *Darwiniana* Pretty Girl y *Darwiniana moliniiforme*, mostró diferencias en los requerimientos nutrimentales de los protocormos *in vitro* con excepción de la completa absorción de  $\text{SO}_4^{2-}$  por las dos orquídeas (Kishi y Takagi, 1997).

Knudson (1922) observó que las semillas de *Cattleya mossiae* germinaron y se diferenciaron en medio de cultivo con sacarosa, mientras que en ausencia del azúcar los embriones no se desarrollaron más allá de pequeños protocormos. Una situación similar se observó con *Cypripedium acaule*, los protocormos generaron hojas y raíces en presencia de azúcares, pero los que no tuvieron la fuente de azúcares siguieron en estado de protocormo sin la misma producción de promeristemo si éstos no reciben un aporte de carbohidratos externo (Leroux, *et al.*, 1995).

La investigación básica en la germinación asimbiótica *in vitro* es importante, ya que la germinación simbiótica de una especie rara o en peligro de extinción puede ser muy difícil y en algunos casos imposible, debido a la dificultad para descubrir, aislar e identificar a los hongos simbiotes específicos (Velázquez, 1997).

La germinación asimbiótica es actualmente utilizada en la propagación de orquídeas tropicales, las mismas que tienden a crecer fácilmente en comparación con las de zonas templadas. El medio usado para la germinación asimbiótica es más completo, que el medio para la germinación simbiótica, ya que todos los nutrientes orgánicos, inorgánicos y los azúcares deben estar disponibles para la orquídea de una forma apropiada puesto que ya no existe la intermediación del hongo (Obaidul, *et al.*, 2000).

Martínez (1991) informó los resultados de su investigación donde hizo la siembra *in vitro* de semillas de frutos verdes (aún no dehiscentes) colectados en campo registrando en algunos el 90% y en el mejor de los casos el 100% de germinación asimbiótica, tal es el caso de las especies *Laelia anceps*, *Lemboglossum ehrenbergii*, *Oncidium stramineum* y *Rhyncholaelia glauca*.

La utilización de semillas para la propagación masiva de orquídeas es conveniente debido a varios factores, los más importantes:

- a) Generalmente son escasas las fuentes de inóculos somáticos de orquídeas para su cultivo *in vitro*, más aún en aquellas en peligro de extinción.
- b) La gran variabilidad genética que nos proporciona la reproducción sexual es de suma importancia para recuperar poblaciones y no individuos idénticos como con la clonación.

La técnica de germinación asimbiótica ha sido utilizada en muy diversas especies de orquídeas con fines de propagación y para estudiar el desarrollo de las plántulas. Manning y Staden en 1987; Harrison y Arditti en 1978; y Gravel 1989 manifiestan que ésta técnica ha permitido obtener conocimientos sobre las características de protocormos y plántulas de ciertos grupos. Se han efectuado estudios sobre la germinación y desarrollo de las semillas de orquídeas en cultivo asimbiótico en medio de cultivo sin glúcidos desde el punto de vista histoquímico, ultraestructural y fisiológico. Sin embargo, ningún estudio morfológico o histológico comparativo había sido efectuado durante la morfogénesis en protocormos cultivados en medio de cultivo sin azúcar (Leroux, *et al.*, 1995).

En la investigación con la orquídea *Cypripedium acaule* Leroux, *et al.*, en 1995 hace un análisis que permite comparar la acumulación de almidón en el interior de las células, donde ocurre la degradación de reservas de naturaleza lipídica y proteínica durante el desarrollo de los protocormos cultivados en dos medios de cultivo diferentes. Lo que permitió discutir las diferentes fuentes de glúcidos utilizables por las semillas de orquídeas en medio asimbiótico o simbiótico y el rol del hongo simbionte.

Las semillas de *Cypripedium acaule* contienen proteínas y lípidos más no almidón: una situación semejante se presenta en otras especies como *Platanthera hyperborea* (Richardson *et al.*, 1992), *Cattleya aurantiaca* (Harrison, 1977), *Spirantes sinensis* (Uetake *et al.*, 1992), *Disperis*, *Hystonaea* (Manning y Standen 1987) y *Dactylorhiza majalis* (Rasmussen, 1990).

Durante la germinación solo los azúcares dextrógiros son utilizables (xilosa, fructuosa, glucosa, manosa, maltosa, sacarosa, trilosa, celobiosa, melibiosa, turanosa, rafinosa, estaciosa, melezitosa), (Arditti 1979; Ernst 1967; Ernst 1970, 1971). La galactosa tiene un efecto inhibitorio sobre la germinación de semillas de orquídeas, causando la ruptura del tonoplasto de células dando lugar a anomalías de la cromatina y de la membrana nuclear (Ernst *et al.* 1970, 1971 y Leroux, *et al.*, 1995).

Otras investigaciones han reportado un crecimiento mayor en presencia de fructosa (Arditti 1967; Burgeff 1936; Ernst, 1967; Withner 1959 y Leroux, *et al.*, 1995). Las plántulas de *Phalaenopsis* germinan mejor con la mitad del contenido de fructuosa o de glucosa (Ernst *et al.*, 1971 y Leroux *et al.*, 1995). Sin embargo, las plántulas de *Cattleya aurantiaca* no crecen bien con fructuosa sino con sacarosa o glucosa (Harrison 1973; Harrison y Arditti 1978 y Leroux, *et al.*, 1995).

La sacarosa es el glúcido más comúnmente utilizado dentro del cultivo de semillas y plántulas de orquídeas más sus efectos pueden variar según la concentración utilizada (Freson 1969; Homés 1973; Homés *et al.*, 1971; Homés *et al.*, 1972, 1973a, 1973b; Vanséveren y Van Espen, 1973 y Leroux, *et al.*, 1995).

Las semillas de orquídeas al no poseer cotiledón ni endospermo son heterótrofas y por lo tanto incapaces de efectuar la gluconeogénesis para transformar los lípidos en azúcares. Esto explica la necesidad de porqué las semillas de orquídeas necesitan de un suplemento externo de carbohidratos para continuar su diferenciación y crecimiento. Por lo que al suplementarle una fuente externa de azúcares a las semillas se estimula la germinación (Velázquez, 1997).

## 2.5 PROPAGACIÓN MASIVA *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS POR SEMILLA

### 2.5.1 Aplicaciones

La aplicación de técnicas de propagación *in vitro* en especies de orquídeas silvestres expuestas a sobre colecta son especialmente útiles. Especies de gran demanda pueden ser producidas y puestas en el mercado disminuyendo así la presión de colecta sobre las poblaciones silvestres. La germinación masiva *in vitro* de especies de orquídeas amenazadas es una forma viable de producir plantas para restauración y reintroducción de poblaciones a su hábitat natural. La investigación ha demostrado que la reintroducción de plantas a sus antiguos hábitats es factible (Stenberg y Kane, 1998).

Muchas especies de orquídeas son demasiado raras en su hábitat natural y se encuentran amenazadas o en peligro de extinción. Se conoce que algunas especies pueden ser representadas por sólo algunas colonias silvestres otras, son endémicas y muy apreciadas.

Estas colonias son amenazadas por colectores, por el desarrollo y aumento de uso de la tierra para la agricultura o por la edificación de construcciones. Las especies pueden ser amenazadas por los desastres naturales como los huracanes o heladas.

Propagar orquídeas de semillas tiene dos objetivos (Niemann, 2001). El primer objetivo de la propagación de especies de orquídeas por semillas evita que posiblemente éstas puedan quedar extintas, y favorecerlas para ser mantenidas en cultivo. Esto mantiene abierta la posibilidad para reintroducir especies al hábitat indicado en algún tiempo a futuro.

Si cada productor seleccionara una sola especie para propagarla por semilla y mantenerla en cultivo, podría ser un gran paso para la conservación de especies de orquídeas.

El segundo objetivo es el de dar solución a la gran demanda comercial con la propagación de plantas de invernadero evitando así el saqueo de zonas naturales, aliviando las grandes presiones que hay sobre las colonias naturales, además de la creación de nuevos híbridos (Niemann, 2001).

Mediante la germinación *in vitro* se puede obtener una enorme cantidad de plantas, ya que de un solo fruto se pueden obtener centenares de miles de semillas que producirían suficientes plantas tanto para restaurar poblaciones *in situ*, como para satisfacer la demanda del mercado mundial (Barba, *et al.*, 2002).

### 2.5.2 Potencial

La germinación asimbiótica *in vitro* acorta el tiempo de germinación de las semillas. En condiciones naturales algunas especies requieren de tres a seis meses para germinar y más de seis meses para el

desarrollo de las plántulas; sin embargo, en condiciones *in vitro* los embriones de las semillas se hinchan debido

a la imbibición, aproximadamente después de los 18 días y empiezan a germinar aproximadamente después de 36 días en cultivo (*Cypripedium montanum*), cabe aclarar que en las semillas de orquídeas el periodo de germinación inicia cuando la semilla se ha embebido y concluye con la aparición de la(s) primera(s) estructuras foliares y radicales. Después de cuatro meses de la germinación algunos protocormos pueden presentar cerca de 10 brotes y 30 raíces (*Cypripedium montanum*) después de seis meses desarrollan plántulas completas (Velázquez, 1997).

La germinación asimbiótica de las semillas, el crecimiento de protocormos y las plántulas *in vitro* ha mejorado su tasa de sobrevivencia por encima de la que prevalece en la naturaleza, obteniéndose miles de plántulas a partir de una sola cápsula (Velázquez, 1997).

Las orquídeas híbridas no siempre naturales, son parte del potencial para crear híbridos artificiales ilimitadamente. Vinculando plantas cercanas como las cattleyas y especies relacionadas se pueden crear nuevos híbridos. El desarrollo de la germinación asimbiótica de orquídeas a partir de semillas hace posible la producción de un enorme número de plántulas en corto tiempo (Murashige, 1973; Ammirato, 1990 y Niemann, 2001).

### 2.5.3 Medio de cultivo

#### 2.5.3.1 Influencia de la composición del medio de cultivo en la germinación *in vitro*

Diversos medios de cultivo son empleados para la germinación, el establecimiento, multiplicación y enraizamiento de plántulas de orquídeas, entre ellos destacan el de Murashige y Skoog (1962), Linsmaier y Skoog (1965), Anderson (1978), Knudson B y C y Thorpe, (1982) (Villalobos, 1985).

Los requerimientos de carbohidratos de los embriones de orquídeas generalmente han sido satisfechos con la incorporación de sacarosa al medio de cultivo en concentración del 2 a 3%. No obstante se han empleado otras fuentes de carbohidratos pero no han demostrado superioridad en relación a éste disacárido Thorpe (1982) (Villalobos 1985).

Las vitaminas más comúnmente incluidas a los medios de cultivo son la tiamina, ácido nicotínico, y piridoxina en concentraciones de 0.1 a 0.4 mg<sup>-1</sup>. El myo-inositol no ha sido esencial sin embargo, su adición ha sido benéfica y se utilizan generalmente 100 mg/l (Villalobos, 1985).

El desarrollo de métodos de germinación asimbiótica para las semillas de orquídeas, captó la atención de los investigadores al realizar experimentos para demostrar que la función principal del hongo es proveer a éstas semillas una fuente de carbono. La adición de azúcar y soluciones minerales utilizadas en el medio de cultivo por el profesor Pfeffer (1845-1920) (citado por Arditti, 1992) sirvieron de base para desarrollar otros medios como el Knudson B, Knudson C, Vacin y Went entre otros. Algunos de ellos son útiles para ciertos géneros y especies que tienen requerimientos especiales, mientras que otros son formulaciones simplificadas las cuales son convenientes para la mayoría de las orquídeas.

Algunos medios nutritivos empleados en el cultivo *in vitro* de orquídeas como el Knudson B y C (1946), el Vacin y Went (1949) y White (1943), originalmente fueron ideados para orquídeas (Hildebrandt, *et al.*, 1946) y (Murashige y Skoog 1962) sin embargo, en otros trabajos se fue modificando ligeramente la composición original de los medios, adicionando o disminuyendo aditivos complejos que al utilizarlos dieron buenos resultados Arditti, 1977 (Ammirato, *et al.*, 1990).

Muchas formulas han sido utilizadas en los laboratorios indicando algún tipo de preferencia. Por ejemplo en laboratorios de Hawaii y Singapur Lim-ho, 1981; Sagawa y Kunisaki, 1982 (Goh, en por Ammirato, *et al.*, 1990) utilizaron Vacin y Went para orquídeas, en cambio en Europa y en América emplea el Knudson C con más frecuencia. El éxito en el uso de éstos dos medios es que satisfacen los requerimientos de orquídeas simpodiales y otras orquídeas, éstos medios son relativamente simples comparados con los utilizados para el cultivo de tejidos de otras plantas.

Generalmente el mismo medio es utilizado para iniciación, multiplicación, diferenciación y desarrollo de plántulas, considerándolo adecuado para el cultivo. Sin embargo, algunos cambios fueron introducidos para diferentes estados de desarrollo, por ejemplo en el laboratorio de Sagawa el medio de iniciación contenía sacarosa al mismo tiempo que el medio de multiplicación era sin sacarosa.

Teo y Wong 1978 (Goh, en Ammirato, *et al.*, 1990) usaron 58 mM (2% p/v) de sacarosa en el medio como fuente de carbohidratos siendo requerida de soporte para la proliferación de protocormos y crecimiento de plántulas. Los investigadores han desarrollado diferentes formulaciones para la efectiva germinación de orquídeas, muchos taxas de orquídeas tienen diferentes requerimientos nutritivos para la germinación de las



semillas y el crecimiento subsecuente de plántulas. Por ésta razón para mejorar la germinación y el crecimiento de plántulas, se han ido modificando los medios suplementándolos con componentes orgánicos solubles.

La utilización exitosa de aditivos orgánicos complejos como extractos de jitomate, de papa, germinado de soya etiolado, de habas verdes o bien de plátano homogeneizado se hicieron principalmente en las etapas de germinación y desarrollo de plántulas de semillas de *Cattleya walkeriana* variando las cantidades de dichos aditivos. Generalmente con altas concentraciones de aditivos orgánicos complejos el proceso de germinación fue inhibido, pero utilizándolos en menor cantidad aumentó la germinación y el crecimiento. Esto puede ser un factor o factores comunes entre los aditivos. Los contenidos de clorofila y carotenos de las plántulas fueron afectados diferencialmente dependiendo del tipo de aditivo y la concentración (Obaidul, *et al.*, 2000).

Adicionar aditivos complejos orgánicos al medio de cultivo para orquídeas es un simple, económico y conveniente recurso para mejorar los medios de cultivo de uso comercial establecidos.

Aunque muchas técnicas fueron desarrolladas para germinación de semillas de orquídeas con medios nutritivos y aditivos orgánicos simples, esto no estableció reglas generales para la adición de aditivos complejos orgánicos, para algún género de orquídea. Un problema con la adición de aditivos complejos orgánicos es la variabilidad de la(s) fuente(s) de los componentes orgánicos utilizados. Estos aditivos pueden producir diferentes efectos dependiendo de la fuente (Obaidul, *et al.*, 2000).

#### 2.5.3.2 Medio nutritivo Murashige-Skoog (MS).

Este medio consiste en sales minerales, una fuente de carbono (generalmente sacarosa), vitaminas y reguladores de crecimiento, contiene la cantidad y proporción de nutrientes orgánicos para satisfacer las necesidades fisiológicas de células de plantas en cultivo. Las células, por lo tanto generalmente tienen requerimientos de suplementos orgánicos no esenciales como aminoácidos, caseína hidrolizada, extracto de levadura o endospermo de coco. Un factor distintivo del medio MS es el alto contenido de nitrato, potasio y amonio en relación con otros medios nutritivos. La composición de sales del medio Linsmaier y Skoog LM es idéntica al de MS. Muchos medios son reportados como adecuados para el óptimo desarrollo celular, con frecuencia depende de la adición de un suplemento orgánico. En muchos casos esos requerimientos pueden ser provistos por el incremento en las concentraciones de sales inorgánicas, particularmente nitrógeno o bien sacarosa y vitaminas (Gamborg, *et al.*, 1976).

En la germinación de *Encyclia boothiana*, se atribuyó la muerte de embriones y plántulas en la fase inicial del estudio por el alto contenido de sales en el medio MS. De 37 medios examinados por (Arditti y Ernst 1984 y Stemberg y Kane, 1998) el MS fue el de más alto contenido de sales minerales. El medio MS es 136 veces más concentrado en comparación al que encontrarán los protocormos en el tronco de un árbol (Arditti y Ernst, 1984). Sin embargo, el MS ha sido usado sucesivamente en el cultivo de tejidos de orquídeas (Arditti, 1977) este medio generalmente no es usado para semillas por lo tanto no es posible una comparación directa entre estudios (Stemberg y Kane, 1998).

#### 2.5.3.3 Medio MS en la germinación asimbiótica de semillas de orquídeas

Martínez en 1991, pone en práctica la germinación asimbiótica de semillas de *Lycaste skinneri* var *skinneri* y reporta que la respuesta en el medio MS tuvo un porcentaje de germinación menor a 10, debido a que es uno de los medios con más altas concentraciones de nutrimentos minerales actuando probablemente de una forma inhibitoria en la germinación de *Lycaste skinneri*, var *skinneri* llegando incluso a necrosar al 100 % de los protocormos cuatro meses después de la germinación.

En reportes de germinación de *Encyclia boothiana* var. *Erythonioides*, se sembraron semillas en cuatro medios de cultivo comercialmente preparados y se evaluó la eficacia de cada medio en la germinación utilizando: Vacin y Went, Murashige y Skoog y Knudson C modificado por adición de micronutrientes y Lindemann para orquídeas. La prueba de medios consistió en el respectivo medio basal suplementado con sales minerales con 2% (peso/volumen) de sacarosa y con 0.8% de agar como solidificador, sin vitaminas ni reguladores de crecimiento, a un pH de 5.5. La germinación comenzó en la segunda semana de cultivo y continuó hasta las ocho semanas. El medio afectó la germinación de las semillas con respecto al tiempo. Contrastando enormemente el valor presentado con la baja germinación ocurrida en VW. La germinación de semillas en medio modificado KC fue alta en comparación con VW, pero baja en comparación con MS y LM. El tiempo sobre la germinación no tuvo diferencias entre MS y LM. Decreciendo la germinación observada en los medios MS y LM ya que después de seis semanas se incrementó la mortalidad de los protocormos. Los

porcentajes de germinación después de ocho semanas de cultivo fueron comparados. La germinación en KC (54.2%) fue la mejor comparada con LM (44.1%) y VW (29.0%).

La germinación en medio MS (51.3%) fue superior en comparación a VW. Los protocormos en KC y MS eran verdes y brillantes los de LM y VW eran cloróticos. Por 12 semanas los protocormos cultivados en VW murieron extremadamente cloróticos. Las semillas de *Cattleya* presentaron la misma respuesta cuando fueron cultivadas en KC o VW. Los protocormos en LM fueron comparados con los de VW, aunque sobrevivieron perfectamente tanto en LM como VW. Las plántulas en KC y MS tuvieron 1 o 2 hojas. El 75% de plántulas en MS produjeron rizoides pero solo una tuvo raíz. El 90% de las plántulas en KC tuvieron rizoides, y seis tuvieron raíces. El 99% de los protocormos en VW murieron después de 16 semanas. La mortalidad fue también alta en LM, menos del 3% de los protocormos sobrevivieron. Las plántulas en MS y KC tuvieron 2-3 hojas, aunque las plántulas con tres hojas eran más comunes en medio KC. Una posible razón para la alta y temprana germinación en MS y LM pudo ser la concentración de amonio en éste medio. MS y LM tuvieron una alta germinación y altos contenidos de amonio 20.61 y 15.14 mM respectivamente. En contraste, KC y VW tuvieron muy bajas concentraciones de amonio (7.56 mM cada uno) y una baja germinación inicial después de las ocho semanas (Stemberg y Kane, 1998).

#### 2.5.3.4 Factores físicos de incubación *in vitro*

Los tres factores esenciales para la fotosíntesis son suficiente luz, calor y bióxido de carbono. La iluminación para crecimiento de cultivos *in vitro* es recomendable que generalmente sea de 16 horas de luz seguidas por 8 de oscuridad Seaton (2000) con un máximo de intensidad luminosa de 1.6 Klux en el invernadero y 1.0 Klux en el laboratorio (Larson, 1992).

La óptima temperatura para maximizar el porcentaje de crecimiento está probablemente en el rango de 22 a 24 °C para muchas especies. Bajando la temperatura se reduce el porcentaje metabólico de las plántulas. Se puede hacer uso de esto si se desea mantener los frascos madre por un largo tiempo, si no se tiene tiempo de trasplantar las plántulas. Se debe tener cuidado de que muy bajas temperaturas pueden causar condensación dentro de los frascos propiciando problemas de contaminación. Las altas temperaturas no solo disminuyen los porcentajes de crecimiento, sino que en algún punto pueden dañarlo (Seaton, 2000).

## 2.6 CARACTERÍSTICAS DE PLANTAS PROPAGADAS *IN VITRO*

### 2.6.1 Morfología y anatomía

Durante el cultivo de tejidos, órganos, semillas o plantas son confinados a un ambiente casi o totalmente hermético y controlado, lo que puede ocasionar modificaciones tanto en la composición de los gases de la atmósfera del frasco de cultivo, como en la morfología, anatomía y fisiología de las plantas (Yue, *et al.*, 1992 y Vázquez, 1994).

En relación a su morfología, las plantas producidas *in vitro*, generalmente son más pequeñas, si se comparan con aquellas que provienen de otros sistemas de propagación (Griffis *et al.*, 1983 citado por Vázquez, 1994). Estudios morfológicos realizados bajo el microscopio electrónico han revelado una cutícula poco desarrollada, tanto en el haz como en el envés de las hojas, además de una considerable disminución o ausencia total de ceras, por lo que la excesiva pérdida de agua es también debida a la deficiencia cuticular que desarrollan durante el cultivo *in vitro*, poseen una morfología distinta a la producida en invernadero, es decir, forman cristales de menor tamaño, que no cubren totalmente la superficie foliar, como ocurre en una estructura cristalina normal. La composición de la cutícula en las plantas cultivadas *in vitro* es diferente, con mayor porcentaje de compuestos polares; ácidos grasos, alcoholes primarios, aldehídos y ésteres, y menor de alcanos y alcoholes secundarios; lo que influye en las propiedades impermeables propias de las ceras, permitiendo *probablemente* una mayor pérdida de agua en las plantas *in vitro*. Las diferencias antes descritas son atribuidas a las condiciones ambientales de cultivo, principalmente; intensidad de luz y porcentaje de humedad relativa. Ya que se ha visto que el aumento en la energía radiante y el descenso de la humedad relativa estimula la producción y depósito de ceras (Sutter, 1981; 1985 y Vázquez, 1994).

Anatómicamente las características descritas en hojas, son; el número de capas celulares, el tamaño de las células del parénquima en empalizada y el grado de diferenciación de éste tipo de parénquima, con respecto a las demás células del mesófilo es menor, lo que repercute tanto en un menor grosor de la hoja, como en grandes espacios intercelulares del parénquima en empalizada. Los estomas son circulares y no

elípticos, el número de estomas en algunos casos es mayor y en otros es menor (Villalobos, 1985 y Vázquez, 1994).

Las raíces generadas *in vitro*, generalmente carecen de ramificaciones y pelos radicales, así como en algunos casos de una completa conexión vascular entre el brote y la raíz que restringe la absorción de agua y el crecimiento.

Otros investigadores han observado una inusual organización de los tejidos, un contenido atípico de células corticales y células hipertróficas en las raíces, derivadas del cultivo *in vitro* (Grout y Aston, 1977 y Vázquez 1994).

### 2.6.2 Fisiología

El resultado final es que el tejido cultivado *in vitro* es fisiológicamente heterótrofo y no autótrofo en su nutrición como lo hacen todas las plantas (Villalobos, 1985).

Además de ser pequeñas requieren de una fuente de carbono exógeno es decir, son plantas heterótrofas y aún cuando puedan parecer fisiológicamente funcionales, es difícil que exista gran actividad fotosintética simplemente porque no es necesario, incluso si la clorofila está presente en las hojas es probable que las enzimas responsables de la fotosíntesis estén inactivas o ausentes.

El pobre desarrollo del aparato fotosintético de las plantas producidas por cultivo de tejidos, puede ser un factor muy importante para que al momento del trasplante sean vulnerables (Vázquez, 1994).

Debido a lo anterior, hay funciones fisiológicas que se ven alteradas como; la relación de peso fresco/peso seco ocasionado por el alto porcentaje del contenido relativo de agua y una menor relación peso seco/superficie en comparación con plantas del invernadero. De la misma forma, se ha descrito que éstas plantas tienen un deficiente control de la transpiración, ya que al someterlas a condiciones de baja humedad relativa *ex vitro* tienden a perder más agua, lo que también se atribuye a la presencia de estomas no funcionales que carecen de la capacidad de modificar su apertura según la humedad relativa del ambiente.

Los autores encuentran una relación lineal entre la tasa de la pérdida de agua y la apertura estomática, tanto en hojas crecidas *in vitro* como en invernadero (Vázquez, 1994).

### 2.6.3 Aclimatización

Los términos de aclimatación y aclimatización se refieren a cualquier cambio en la estructura o función del organismo que le permite encajar mejor en las condiciones del ambiente. La aclimatación es un proceso regulado por la naturaleza, mientras que la aclimatización es regulada por el hombre (Vázquez, 1994).

El proceso de aclimatización más empleado es el del descenso gradual de la humedad relativa, el cual permite a las plantas desarrollar mecanismos de protección a las nuevas condiciones ambientales, ya que se ha visto que los problemas que se presentan durante la aclimatización están relacionados principalmente con las variaciones de humedad. Además de ser el procedimiento más rápido, menos costoso y más práctico con el que generalmente se obtienen buenos resultados, éste puede hacer uso de bolsas de plástico sobre la maceta, túneles de PVC, láminas de plástico transparente que cubran las plantas trasplantadas a invernadero o cámaras de crecimiento de ambiente controlado o semicontrolado (Vázquez, 1994).

## 2.7 TRASPLANTE DE PLÁNTULAS DE *IN VITRO* A *EX VITRO*

### 2.7.1 Factores biológicos que influyen en el trasplante

Se ha recomendado colocar los cultivos *in vitro* en el invernadero por algunos días antes de sacar las plantas, esto con la finalidad de lograr una pre-adaptación a los regímenes de luz y temperatura que prevalecerán en el invernadero durante el trasplante. Con tal procedimiento se puede ocasionar un problema de acumulación de calor al tener los recipientes de cultivo tapados debido a un “doble efecto invernadero” éste problema puede remediarse removiendo la tapa siempre y cuando se procure a las plantas una humedad relativa alta para prevenir su desecación. En éste punto, la posible introducción de microorganismos contaminantes también es un problema de importancia (Villalobos, 1985).

En los frascos las plántulas se han desarrollado en un ambiente cerrado y estéril por lo que deben acostumbrarse gradualmente al ambiente externo antes de ser trasplantadas a macetas (McKendrick, 2000).

La transferencia de plántulas desde condiciones asépticas *in vitro* a condiciones ambientales normales tiene que efectuarse cuidadosamente o pueden perderse grandes cantidades de plantas en este paso considerado como crítico. Las causas de la muerte son deshidratación, infección por microorganismos,

malnutrición, etc. Es necesario controlar cuidadosamente durante el proceso de adaptación el cambio de la condición heterótrofa a una condición autótrofa y evitar al máximo las pérdidas de agua para obtener una alta sobrevivencia de las plántulas (Villalobos, 1985).

Las plántulas enraizadas en un ambiente externo por lo general regulan sus mecanismos fisiológicos al mismo tiempo de la inducción de raíces.

Otra razón de la rápida desecación *in vivo* de las plántulas obtenidas *in vitro* es debida a la carencia de raíces capaces de funcionar inmediatamente en el sustrato, conduciendo al marchitamiento y muerte debido a la falta de reemplazo del agua perdida por sus hojas.

Por lo anterior la forma de incrementar la sobrevivencia de las plántulas obtenidas *in vitro* es colocándolas a la sombra y una muy alta humedad hasta que las hojas nuevas se hayan formado y sean funcionales lo que a su vez facilitará la formación de raíces nuevas más desarrolladas y mejor adaptadas (McKendrick, 2000).

El enraizamiento satisfactorio de las plántulas es crítico puede inducirse antes o después de extraer las plántulas del recipiente de vidrio. Sin embargo, probablemente las raíces producidas *in vitro* no sean funcionales cuando se trasplanten a suelo y posteriormente éstas sean reemplazadas por raíces nuevas durante el período de endurecimiento y no será sino hasta este momento que de verdad se haya inducido un sistema radical completamente eficiente (McKendrick, 2000).

Aparte de la disfuncionalidad de las raíces formadas *in vitro*, muchos investigadores prefieren éste método como una técnica adecuada dentro de las operaciones de producción al otorgarle las ventajas siguientes; alta sobrevivencia, porcentajes de enraizamiento altos y mejor uniformidad de las plantas (Vázquez, 1994).

#### 2.7.1.1 Tamaño de la plántula y estructuras presentes.

Para la propagación *in vitro* de *Dendrobium* y *Vanilla planifolia* se inició la etapa de adaptación cuando las plántulas presentaron un mínimo de 5 cm de longitud total, removiéndolas de los frascos y sembrándolas en macetas con sustrato (Goh, 1989), este tipo de datos aportan información valiosa para la aclimatización de otras especies como el caso de *Prosthechea vitellina*.

En estudios de germinación y adaptación a invernadero de *Mormodes rosilloana* y *Encyclia vitellina* se reportó la obtención de plántulas con raíces (de 1 a 3) y pseudobulbos de tamaño reducido. La aclimatización de las plantas al invernadero, no tuvo éxito. Posiblemente un mayor tamaño de las plantas *in vitro* podría reducir los riesgos durante la aclimatización (Ramírez, 1990).

Plantas de *Lycaste skinneri* y *Lycaste aromática*, desarrolladas *in vitro*, con 8 cm o más de longitud, se consideraron adecuadas para su adaptación por lo tanto fueron llevadas a condiciones de invernadero, logrando una buena aclimatización (Martínez, 1991).

Las plantas que se obtienen a través de la micropropagación, presentan en un inicio un tamaño pequeño, siendo esto una desventaja para sobrevivir a condiciones *ex vitro*. Algunos autores consideran que las plantas mayores de 5 cm se establecen mejor que aquellas que miden menos de 3 cm Poole y Cnover 1983 (Vázquez 1994).

En la reintroducción de *Ipsea malbarica*, se menciona que se seleccionaron plantas con dos y cuatro hojas, además de dos a seis raíces para someterlas a la fase de adaptación a *ex vitro*, manteniéndolas durante dos meses sembradas en macetas, para su posterior reintroducción (Gangaprasad, *et al.*, 1999).

*Phalaenopsis* a los seis meses de edad, tiene una o dos hojas y raíces, lista para resembrar a frascos con medio fresco en recipientes con más espacio para permitirles crecer adecuadamente. A los nueve meses de crecimiento *in vitro* las orquídeas jóvenes están lo suficientemente maduras para ser trasladadas al invernadero. Se seleccionan las plantas y las siembran en musgo, para pasar luego al invernadero, donde pasarán entre tres y cuatro meses más. En invernaderos las orquídeas pasan otros nueve meses para llegar a ser plantas adultas y listas para producir flores. Eso quiere decir que desde la siembra de la semilla en laboratorio, pasan exactamente 18 meses ([www.teletica.com/archivo/7días/2002/06/flores htm](http://www.teletica.com/archivo/7días/2002/06/flores.htm)).

#### 2.7.1.2 Enfermedades y plagas en invernadero

En cultivos de orquídeas, pueden aparecer problemas de ataques de hongos, bacterias y virus, siendo las infestaciones fungosas las más comunes y generalmente, las más fáciles de erradicar. Las infecciones de bacterias son más raras y hasta cierto punto, también controlables con facilidad. El ataque de hongos ya sea inicial o severo, por descuido o desconocimiento, es generalmente inesperado. Lo provoca un cultivo

inadecuado, como sombra excesiva combinada con mala ventilación y exceso de riego. Los daños por insectos chupadores también pueden ser invadidos por hongos, agravando el daño.

Para evitar en lo posible todo esto, hay que cultivar adecuadamente y fumigar preventivamente, con fungicidas de contacto y/o sistémicos, especialmente durante la estación de las lluvias y frío intenso por las noches. Calor por el día y mucho frío por la noche son condiciones ideales para que prosperen los hongos (Altaverapaz, 1993).

El término enfermedad es con frecuencia utilizado para incluir desórdenes causados por factores fisiológicos (como el exceso o la falta de nutrientes y/o agua, contaminación, temperaturas extremas, etc.) Durante el trasplante la mayoría de las enfermedades son causada por hongos, bacterias y virus patógenos (Arditti, 1987).

Cuando se utilizan mezclas de sustratos sin esterilizar, trae como consecuencias serios problemas de contaminación por microorganismos patógenos. Si bien las plantas en general pueden tener alguna capacidad genética de resistencia a las enfermedades, cuando son sacadas de los frascos de cultivo, son muy susceptibles al ataque de enfermedades o patógenos en general. Por lo tanto la esterilización del sustrato y contenedores; además de una buena higiene de trabajo es fundamental (Villalobos, 1985).

La enfermedad más común en las orquídeas es la putrefacción negra, también se sabe que cuando un tono oscuro cubre la raíz es que está infectada. Esta enfermedad la causa el hongo *Phytopora palmivora*, que es capaz de atacar a las plantas en estado de crecimiento Thompson, (1958); Ting y Ho, (1970); Sanderson y Yong, (1972). Otra enfermedad fungal es la antracnosis, causada por *Collectotrichum gloeosporioides* (el estado imperfecto de *Glomerella cingulata*) y la putrefacción basal causada por *Sclerotium rolfsii* Sacc. Ting y Ho, (1970). La enfermedad bacterial de la putrefacción blanda, causada por *Erwinia carotovora* ha sido observada en *Phalaenopsis* (citados por Goh y Karalgian, 1989). Sin embargo, las enfermedades más serias de orquídeas son las causadas por virus, por ej., el virus del mosaico de cimbidium y manchas del virus de *Odontoglossum*. El síntoma usual del patrón del mosaico es la aparición de manchas cloróticas en las hojas junto con otros síntomas específicos en los géneros. Las plantas infectadas por virus son generalmente cortas y con anomalías en las flores o malformadas (Sheehan, 1992 citado por Larson, 1992).

Como las cepas de los hongos se inmunizan rápidamente ante determinado agente activo en el fungicida, conviene cambiar de fórmula después de cada segunda aspersion, alternando, por ejemplo, un buen fungicida a base de cobre con otro a base de zinc y manganeso en un control puramente preventivo (Altaverapaz, 1993).

Las condiciones ambientales propicias para un buen crecimiento de las orquídeas son también favorables para el desarrollo de las plagas. Diferentes plagas las atacan, comúnmente siendo las escamas, ácaros rojos, caracoles y cucarachas algunas de las plagas más problemáticas (Larson, 1988 y 1992).

Las plagas son un serio problema para las orquídeas, a veces marcando el follaje o en ocasiones destruyéndolas por completo. Es mejor prevenir utilizando buenas prácticas de cultivo que sean desfavorables para la proliferación de organismos (Larson, 1988 y 1992).

## 2.7.2 Factores físicos que influyen en el trasplante

### 2.7.2.1 Humedad relativa

Los elementos del medio ambiente a considerar en la aclimatización de plántulas de orquídeas son principalmente; la humedad, la circulación del aire, la luz y la temperatura (Noble, 1991).

El aire seco extrae la humedad de las hojas. La tasa de evaporación depende de la diferencia entre el agua en las hojas y la humedad en el aire. No es necesario que la atmósfera tenga una alta humedad. Las plantas necesitan también estar alternadamente secas y mojadas. La humedad provee una apropiada atmósfera para el cultivo, puede ser propiciada humedeciendo el suelo del invernadero asperjando las plantas y el aire con nebulizadores (Noble, 1991).

Con los sistemas de micro-aspersion se incrementa el contenido de humedad del sustrato y cuando es muy alto se pueden provocar niveles anormales de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> que pueden inhibir el crecimiento de las plantas en proceso de adaptación. En general se recomienda que las plantas producidas *in vitro* una vez transplantadas se mantengan en un ambiente cerrado para mantener con mayor eficiencia una humedad relativa alta sin necesidad de incrementar el contenido de humedad al sustrato (Villalobos, 1985; Vázquez, 1994).

En la micropropagación de *Encyclia vitellina* (Ramírez, 1990) a pesar de haber obtenido plántulas completas con 2 a 5 raíces y de un tamaño mayor además de que el 12% desarrolló pseudobulbos al sembrarlas en sustrato perecieron todas, por problemas de aclimatización de las plántulas propagadas *in vitro* (Ramírez, 1990).

### 2.7.2.1 Riego

Durante la aclimatización mueren más orquídeas por el sobre-riego que por cualquier otro factor. El riego y la calidad del agua utilizada para las orquídeas son los factores ambientales más importantes del cultivo de orquídeas.

Deben regarse completamente y luego estar sin riego hasta que la superficie del sustrato comienza a deshidratarse. El número de días que tarda éste proceso está influido por las condiciones climáticas, los tipos de recipiente, el medio y tamaño de la planta en la maceta (Larson, 1988).

La calidad del agua es tan importante como la cantidad aplicada. Las orquídeas pueden ser regadas con agua que tenga un rango de pH de 4 a 9, el agua dura o suave no es recomendable en el crecimiento de las orquídeas, no se deberá utilizar en un sistema de riego del sustrato ni en un sistema elevado de aspersión porque las hojas de las orquídeas pronto estarán cubiertas con una fina película de cristales de calcio. El factor más importante a considerar es el nivel de sales solubles en el agua. El agua que tiene sales solubles de menos de 125 ppm es excelente, de 125 a 500 ppm es buena, de 500 a 800 ppm se deberá utilizar con precaución y el agua por encima de los 800 ppm no es apropiada para el cultivo de orquídeas (Larson, 1988 y 1992).

### 2.7.2.2 Ventilación, luz y temperatura

Las orquídeas requieren de una adecuada atmósfera y una buena ventilación. Situarlas en zonas donde circule aire fresco es lo adecuado para un buen crecimiento. Una ventilación adecuada ayuda a mantener la temperatura y la humedad en los niveles deseados, pero la exposición a corrientes de aire caliente y frío pueden provocar enfermedades.

En la cámara de crecimiento de un laboratorio, tanto la luz como la temperatura son prácticamente constantes, la humedad en los frascos es alta y las plantas están protegidas de ataques de hongos, bacterias y herbívoros. En el medio natural, temperatura y luz varían constantemente. Las nuevas plantas deben estar protegidas de manera especial de la fuerte luz solar, incluso una pequeña cantidad de luz solar podría quemar las hojas de estas plantas que usualmente crecen en la sombra (McKendrick, 2000).

Durante la aclimatización la temperatura debe de ser templada ya que las plantas se desarrollan mejor a temperaturas entre los 20<sup>o</sup> y 27<sup>o</sup> C, por lo que para la aclimatización temperaturas más bajas o más altas y/o fluctuaciones muy drásticas pueden dar como resultado un crecimiento muy irregular. El desarrollo de raíces puede acelerarse con el uso de camas calientes especialmente cuando la temperatura del ambiente es baja (Villalobos, 1985).

Con respecto a la luz algunas especies reactivan su autotrofia cuando en las fases finales del cultivo se les aplican altas intensidades luminosas, sin embargo algunas otras especies reaccionan negativamente a la iluminación intensa; a estas especies se les puede exponer como otra opción a un fotoperíodo con días cortos (por ejemplo ocho horas de luz por 16 de oscuridad) que inducirá la acumulación de nutrientes en el tejido. Las plántulas necesitan ser mantenidas a 1.0 klux antes de ser transferidas y crecer bajo condiciones de invernadero (Larson, 1992).

En general se ha observado que las plantas producidas por cultivo de tejidos una vez transplantadas, muestran un mejor desarrollo y mayores porcentajes de sobrevivencia si al principio, se mantienen a intensidades lumínicas bajas, alrededor de 1.5 Klux. El fotoperíodo debe mantenerse, si es necesario, igual que en el laboratorio y durante todo el periodo de adaptación. Para regular la intensidad lumínica en el invernadero se recomienda utilizar mallas para proporcionar diferentes porcentajes de sombra (Villalobos, 1985).

### 2.7.2.3 Tipos de sustrato y características

Existen diversos materiales que se pueden utilizar como sustratos de enraizamiento tales como el musgo esfangineo, perlita, vermiculita, tezontle, corteza de pino, corteza de encino, carbón activado, tallo de helecho arborecente, espumita, arena, suelo, etc., dentro de los cuales las plántulas son colocadas después de ser removidas de las condiciones *in vitro*. Estos sustratos pueden ser utilizados solos o mezclados entre sí en diferentes proporciones pero hay que señalar que puede haber diferencias marcadas en la formación de raíces según el sustrato o mezcla de estos que sea utilizada, p. ej. el musgo puede ser un sustrato muy ácido para la formación de las raíces de algunas especies, así como la vermiculita podría ser muy alcalina para otras (Easton, 2002).

El tipo de sustrato a utilizar depende del microclima del lugar donde crecerá la planta, de la especie a cultivar, y del grosor de las raíces. Hay especies del género *Paphiopedilums* y *Phalaenopsis*, que requieren un sustrato permanentemente húmedo. Para ellas se utiliza un sustrato compuesto por un 75% de corteza de pino y 25% de esfagnum. En la base, para favorecer el drenaje, se pone una capa de 4 a 5 cm de grosor de carbón activado o pedacera de cerámica. Para las cattleyas, cuyo sustrato debe secarse por completo entre riego y riego, se debe utilizar: 75% de corteza de pino, 10% de musgo sphagnum y 15% de carbón vegetal (<http://www.orquideas-katia.com/castellano/Sustratos.htm>).

El tipo de sustrato utilizado para el cultivo variará, dependiendo de si la orquídea es epífita o terrestre. Las epífitas (por ejemplo cattleyas) requieren que el medio sea similar al natural. La mayoría de las orquídeas epífitas pueden ser cultivadas en fibra de *Osmunda*, fibra de helecho arborecente, tallo del helecho arborecente (maquique), corteza de abeto, corteza de encino, agrolita, carbón activado.

Estudios realizados por Poole, 1977 (Larson, 1988) han indicado que tanto las orquídeas terrestres como las epífitas pueden ser cultivadas en una mezcla de turba y perlita (1:1 v/v) con excelentes resultados. La utilización de éste medio para cultivo de orquídeas parece prometedor. Los cultivadores que han tratado de adoptar este método dicen que el ajuste de la cantidad de agua para evitar el sobre riego es la fase más crítica.

Es importante para la mayoría de las plantas la acidez o alcalinidad de un sustrato y es necesario considerar su capacidad de retención de humedad, su capacidad de aireación, etc. (Villalobos, 1985).

Una mezcla de vermiculita-agrolita-esfagnum satisface en general, los requerimientos de un sustrato para aclimatización, ya que retiene agua y nutrientes, está exento de microorganismos libres y provee un buen drenaje y ventilación, además de que las plantas enraizadas pueden ser removidas sin daño de su sistema radical. Como se mencionó puede implementarse el enraizamiento en diferentes sustratos pero siempre habrá uno o una mezcla que sea mejor para la especie y las condiciones particulares con las que se esté trabajando por ejemplo: otras mezclas recomendadas para las orquídeas son arena-esfagnum-perlita en proporción 1: 2:1 (v: v: v), arena-musgo (1:1) entre otras.

Las mezclas de sustratos pueden influir en el porcentaje de sobrevivencia y en el posterior desarrollo de las plantas. Las distintas especies se pueden desarrollar bien en diferentes sustratos sin que exista una norma general para todas las plantas con respecto a que sustrato utilizar; sin embargo, es aconsejable emplear los sustratos en los cuales las especies normalmente se desarrollan al utilizar los métodos convencionales de propagación vegetativa (Villalobos, 1985).

Los extremos cuidados fitosanitarios y de control de la deshidratación se irán reduciendo conforme las plántulas producidas *in vitro* se vayan aclimatizando. Para que las plantas, tengan un mejor desarrollo durante el proceso de aclimatización, se pueden plantar asépticamente en macetas con alguna mezcla de sustrato estéril durante un periodo de tiempo corto, ésta practica ha dado buenos resultados en plantas carnívoras.

Utilizando en lugar de suelo sustratos inertes como la vermiculita, agrolita, perlita, arena, tezontle, etc., se reducen notoriamente los problemas de infecciones microbianas ya que el sustrato y la solución nutritiva son fáciles y rápidos de esterilizar además de no proporcionar un ambiente adecuado para la proliferación de microorganismos (Thomas 2000).

Por ejemplo, (Thomas y Thomas 2000) cultivaron orquídeas en perlita con resultados favorables, la textura de la perlita asegura un constante suplemento de nutrientes a la planta dado por la acción de capilaridad que es única en éste sustrato. Así mismo encuentra sobresaliente que en este método de cultivo es que no existe posibilidad de sobre riego y siempre se cuenta con una excelente aireación (<http://www.multiperlita.htm>).

Conociendo las características de cada sustrato es posible hacer mezclas que reúnan los requerimientos más apropiados a las necesidades de las orquídeas, Thomas y Thomas (2000) hacen una comparación de cuatro sustratos de distintos (Cuadro 1) que pueden ser apropiados solos o mezclados.

	CORTEZA	TURBA	LANA MINERAL	AGROLITA
pH del sustrato	Levemente ácido	Ácido	Levemente alcalino	Neutro
Control de fertilizantes	Bueno	Bueno	Bueno	Muy bueno
Permeabilidad	Alta	Suficiente	Suficiente	Muy alta
Aireación	Buena	Suficiente	Suficiente	Muy alta
Riesgo sanitario	Cuidar	Cuidar	Cuidar	Cuidar
Esterilidad	No	No	Si	Si
Manejo	Fácil	Fácil	Complicado	Muy fácil
Adaptación a macetas	Buena	Buena	Buena	Muy buena
Nutrientes	Mínimo	Mínimo	Nada	Nada
Saturación de agua	Si	Si	Si	No
Intercambio catiónico	Si	Si	No	No

Cuadro 1. Propiedades comparativas de los medios más usados en orquídeas  
(<http://www.multiperlita.htm>)

#### 2.7.2.4 Soluciones nutritivas y fertilización

Durante el proceso de adaptación de las plantas obtenidas en el laboratorio, la adición de nutrimentos al sustrato puede ayudar a incrementar la sobrevivencia y mejorar el vigor, para ello se pueden utilizar los fertilizantes comerciales, agregándolos directamente al sustrato o bien regar las plantas con las sales inorgánicas del medio de cultivo o con soluciones nutritivas específicas. La aplicación foliar de nutrientes también puede ser muy útil, además de proporcionar nutrientes a las plantas, ayuda a prevenir la deshidratación (Villalobos, 1985; Vázquez, 1994).

Las orquídeas deben fertilizarse cada dos semanas para obtener un crecimiento máximo. Esto por supuesto, si se les proporciona la luz, temperatura y agua en cantidades apropiadas. La fertilización se aplica durante el periodo de actividad de las plantas, ya que en los periodos de descanso se acumulan las sales que no utilizan. La cantidad de fertilizante utilizado variará con el medio (Larson, 1988).

La osmunda, maquique y mezclas orgánicas, se deberán fertilizar con una proporción, 10:10:10. Las cortezas se deben fertilizar con una proporción 30:10:10. Los medios de corteza requieren una cantidad adicional de nitrógeno para balancear a la requerida por la gran cantidad de microorganismos que descomponen la corteza en los recipientes. Sin embargo, ya que la corteza se descompone muy lentamente, no hay peligro de una liberación rápida de nitrógeno fijado por los microorganismos durante el tiempo que el medio está en la maceta. Se han utilizado fertilizantes exitosamente de lenta liberación en las orquídeas. Si se utilizan soluciones nutritivas foliares o para el sustrato se deben aplicar las mismas cantidades de fertilizante y en las mismas proporciones (Larson, 1988 y 1992).

En el trabajo de los doctores Thomas y Thomas (2000) reportan la fórmula de la solución fertilizante que ellos consideran adecuadas para una gran variedad de orquídeas (Cuadro 2).

Elemento	Cantidad	Elemento	Cantidad
N	49 ppm	Fe	0.37 ppm
P	18 ppm	Cu	0.0035 ppm
K	76 ppm	Mo	0.05 ppm
Ca	42 ppm	Zn	0.11 ppm
Mg	14 ppm	Mn	0.33 ppm
SO <sub>4</sub>	18 ppm	B	0.10 ppm

Cuadro 2. Composición química de la solución fertilizante para orquídeas (<http://www.multiperlita.htm>)

Usar el tipo adecuado de fertilizante es muy importante para el buen crecimiento y desarrollo de las orquídeas epífitas. La mayoría de los sustratos usados para cultivar orquídeas carecen de los nutrientes esenciales para el normal crecimiento y desarrollo de la planta. Los sustratos orgánicos (corteza y musgo) liberarán cantidades pequeñas de minerales a medida que se descomponen, pero estos son insuficientes para una buena nutrición de la planta. Todos los fertilizantes están constituidos por tres ingredientes principales: Nitrógeno (N), Fósforo (P) y (Potasio (K).

Estos elementos se utilizan en distintas proporciones con base a las diferentes necesidades de las plantas a lo largo del año. La proporción en que se encuentran en un fertilizante está indicada por un código de tres números, en el cual el primer número corresponde al porcentaje de nitrógeno, el segundo número al porcentaje de fósforo y el tercer número al porcentaje de potasio.

Por mucho tiempo se pensó que los sustratos basados en corteza de árbol adsorbían el nitrógeno del fertilizante, no dejándolo disponible para las raíces de las plantas de orquídea, por lo que se requería usar, en estos sustratos, un fertilizante rico en nitrógeno (30:10:10). Sin embargo, ahora se sabe que esto no es cierto.

Para ayudar a promover la floración de la planta, se puede utilizar un tipo especial de fertilizantes, llamados de "estimulación de la floración", cuya proporción sea más alta en fósforo, tal como 3:12:6, este tipo de fertilizante debe ser aplicado antes de la formación de las yemas florales, lo que requiere del conocimiento del ciclo anual de crecimiento y floración de la orquídea. Se recomienda usar aquellos formulados



especialmente para orquídeas y que sean solubles en agua (polvo o gránulos que se pueden disolver en agua antes de usar (<http://www.orquidea.cl-cuidados-fertilizante.htm>).

Si no se tiene conocimiento sobre los requerimientos específicos de una especie de orquídeas es mejor que se utilice un fertilizante balanceado a lo largo de todo el año (ejemplo, 7:9:5).

Si se cuenta con más experiencia, se recomienda utilizar un fertilizante balanceado o rico en nitrógeno cuando la planta está creciendo vegetativamente (formando hojas y tallos) cambiar a un fertilizante rico en fósforo en la época adecuada para estimular la floración. Algunas orquídeas requieren un receso en la fertilización una vez que el crecimiento y la floración se han completado (cuando la planta se encuentra en periodo de descanso) (<http://www.orquidea.cl-cuidados-fertilizante.htm>).

Si las orquídeas son fertilizadas en forma excesiva, entonces los síntomas visibles son:

1. Acumulación de sales (cristales blancos o amarillo pálido) en el sustrato de crecimiento o alrededor de la parte exterior de la maceta.
2. Raíces ennegrecidas (quemadas) al entrar en contacto con esta acumulación de sales. Si la acumulación de sales es excesiva, la planta puede morir.
3. Puntas de las hojas ennegrecidas o muertas.

Para evitar estos problemas, se debe alternar el riego con agua destilada y el agua con fertilizante diluido. Esto permitirá que el agua de riego usada entre las fertilizaciones, lave el exceso de fertilizante, sales y minerales del sustrato de crecimiento (<http://www.orquidea.cl-cuidados-fertilizante.htm>).

## 2.7 REINTRODUCCIÓN DE ORQUÍDEAS A ZONAS NATURALES

### 2.7.1 Antecedentes de reintroducción

México ha reconocido la urgente necesidad de proteger su flora, en particular la Orchidaceae por la depredación general por colectores profesionales y aficionados, esto además de la destrucción general de hábitats, ha causado un enorme decrecimiento en las poblaciones naturales. La alta demanda y la aparente capacidad de compra de los norteamericanos y europeos les asegura el primer lugar en la depredación del bosque tropical, en particular gran parte de las flores cattleyas, brasavolas, sophonitis, laelias, odontoglossums, oncidiums y miltonias, por mencionar algunas. Además de la demanda de orquídeas miniatura como masdevalias, lepanthes, rodriguezias, psygmorchis, notylas y muchas otras (Bennett Jr, 1988).

Los resultados de diversos trabajos de germinación *in vitro* y su posterior adaptación a *ex vitro*, para finalmente recuperar poblaciones amenazadas o en peligro de extinción, en zonas naturales arrojan resultados alentadores.

En 1987 en la reintroducción de *Paphiopedilum rothschildianum*, en Kota, al este de Malasia, se llevaron 100 plántulas para su establecimiento y se reporta que un año después de su reintroducción la mayoría de las plantas lograron establecerse desarrollando nuevas estructuras como hojas y raíces sanas y bien adaptadas (Grell, 1988).

También podemos mencionar la reintroducción de *Bletia urbana*, en la cual además de la exitosa obtención *in vitro* de plantas sanas se adaptaron a condiciones de invernadero para su posterior trasplante a condiciones naturales, teniendo una sobre-vivencia en el invernadero del 100%. La tendencia de las poblaciones de plantas llevadas a campo en general fue la pérdida de las hojas. Sin embargo éste factor ha sido considerado como una propensión natural de muchas plantas de regiones estacionalmente secas. La respuesta de éstas orquídeas es la defoliación y la persistencia del bulbo hasta la siguiente temporada de lluvias. Algunas de las plantas desarrollaron nuevas hojas, implicando una adaptación al medio ambiente.

La sobrevivencia en campo de *Bletia urbana* fue del 56% de los bulbos registrados suponiendo que la pérdida de bulbos fue debido a los depredadores o algún otro factor, posiblemente porque las plantas reintroducidas fueron obtenidas a partir semillas germinadas en el laboratorio, por lo que se asumió que hay diferencia en su variabilidad genética en comparación con variabilidad genética de las poblaciones naturales. Un año después del trasplante las poblaciones fueron examinadas nuevamente para determinar su sobrevivencia, comprobando que el 15% de los bulbos originales reiniciaron su crecimiento. Se hace mención de que ésta investigación demuestra claramente que mediante técnicas de cultivo *in vitro* es posible el rescate de especies amenazadas y la parte del ciclo de vida de *Bletia urbana* fue sucesivamente completado (Rubluo, et al., 1989).

En 1987 y 1988 fueron reintroducidas *Lycaste aromática*, *Lycaste skinneri var skineri*, y *Oncidium stramineum*, en el Parque Nacional "Lagunas de Montebello" Chiapas, cerca de colonias silvestres de *L.*

*skinneri*. Se obtuvo a los 6 meses de evaluación 69% de sobrevivencia y 60% para *L. aromática*, y para *O. stramineum* 40% después de un año de evaluación (Martínez, 1991).

Es de gran importancia establecer mejores condiciones hortícolas de pre-reintroducción de las plantas, proporcionándoles una pre-adaptación paulatina para así poder protegerlas de la deshidratación y de las plagas

que puedan atacar a las plantas durante los primeros meses de adaptación en el hábitat natural (probablemente 1 año), periodo en el cual pueden eliminar cualquier alteración que haya desarrollado durante su cultivo *in vitro* o invernadero, por ej. Fisiológico (falta de capas cerosas, apertura y cierre no adecuado de estomas, entre otras, tipo de suelo, pH, dureza, establecimiento eficiente de los mecanismos bioquímicos (metabolitos secundarios) que puedan actuar en defensa de sus depredadores naturales como los herbívoros (larvas de lepidópteros) o el establecimiento adecuado de la simbiosis con micorrizas, sin que desemboque en su inicio en un parasitismo. Lo anterior es fundamental para establecer su equilibrio ecológico. Esto garantizaría una mayor sobrevivencia y un restablecimiento de la población (crecimiento, fructificación y progenie fértil por varias generaciones) (Martínez, 1991).

Las especies y poblaciones en el campo están bajo continuas presiones de selección que determina la naturaleza de las mismas durante la evolución. El hombre interfiere con las poblaciones silvestres y causa interferencias con la presión de selección y estados de cambio natural de las especies. Esto es particularmente cierto cuando los métodos artificiales de propagación son utilizados. Por lo tanto la propagación *ex situ* interfiere con la evolución natural de las especies de muchas maneras. Durante el crecimiento temprano y desarrollo, la mortalidad de la progenie es muy alta y la selección restrictiva permite que sólo un porcentaje muy pequeño de genotipos sobreviva. Bajo condiciones de vivero esas restricciones disminuyen y un gran número de plantas sobrevive. Más esto no podría suceder bajo condiciones silvestres normales (Pridgeon, 1996).

Por otra parte *Encyclia boothiana* var. *erythronioides* una orquídea epífita nativa del sureste de México, Centroamérica y el sur de Florida, ha estado expuesta a sobrecolecta y sus poblaciones han decrecido significativamente, por lo que se hizo investigación para tener un protocolo para la producción de un gran número de plantas para su reintroducción ya que es una especie que se encuentra amenazada actualmente. En un esfuerzo para preservar una especie rara de orquídea nativa, la germinación de semillas *in vitro* puede ser una poderosa herramienta (Stenberg y Kane, 1998).

Los resultado de éstos experimentos demostraron que *Encyclia boothiana* var. *erythronioides*, fue propagada por cultivo de semillas *in vitro*. La utilización de cápsulas maduras de semillas como fuente de semillas acorta el ciclo reproductivo por 1.5-2.0 meses aproximadamente. La primera ventaja de ésta metodología, sin embargo, está en el incremento en los valores de sobrevivencia de las plántulas. Miles de plántulas pueden ser aprovechadas para la restauración y reintroducción por la utilización del protocolo arriba mencionado. La investigación preliminar ha demostrado que la reintroducción de plantas es factible (Stenberg y Kane, 1998).

## 2.7.2 Sobrevivencia de las plantas reintroducidas

### 2.7.2.1 Factores que afectan la sobrevivencia

En plantas liberadas en 1987, de *Oncidium stramineum*, Martínez (1991) obtuvo en sus resultados una drástica disminución en la sobrevivencia, debido probablemente a que no tuvieron una pre-adaptación a condiciones de invernadero, ya que salieron directamente del frasco al campo, además de que las lluvias no se habían establecido en la región. Esto pudo haber actuado como limitante en la adaptación. Estudios sobre la reintroducción de las orquídeas *Lycaste aromática* y *Lycaste skinneri*, registró que en una de las localidades de liberación de las plantas hubo una disminución notable. Lo anterior fue debido probablemente a que en una de las localidades las plantas estuvieron más expuestas a las corrientes de aire que ahí prevalecen, además de que la plantación se hizo en los troncos o eje principal de los encinos donde presentaban poco sustrato orgánico acumulado, lo que afectó la sobrevivencia de *Lycaste skinneri* y *Lycaste aromática*, en ésta investigación utilizaron plantas de dos años 10 meses y dos años un mes de edad respectivamente encontrándose en etapas juveniles todavía. Esto nos da una idea de lo largo que puede ser el proceso de propagación masiva aunque es variable dependiendo de cada especie (Martínez, 1991).

Por otra parte, se obtuvieron plantas de la germinación *in vitro* de semillas de *Ipsea malabarica*, para restaurar poblaciones en dos diferentes localidades en el bosque, durante los meses de junio y julio de 1995, se seleccionaron plantas con tres o cuatro hojas y cuatro a ocho raíces, para removerlas de las macetas y ser llevadas a su hábitat natural, después de la liberación las plantas permanecieron con signos de marchitamiento los primeros tres meses tiempo en que las macetas habían sido ya cubiertas de hierba, haciendo difícil la

localización de las plantas introducidas y la remoción de las especies asociadas por lo que fue necesario el establecimiento de revisiones posteriores. No obstante las estructuras restantes (pseudobulbos y raíces) estaban intactas y después de 10-12 meses el 75.8 y el 78.5% de éstas estructuras brotaron nuevos retoños. Sin embargo, el incremento en el decline marginal del porcentaje de establecimiento fue evidente después de 24 meses.

El establecimiento de las plantas micropropagadas tuvo una frecuencia cercana o casi igual en los dos hábitats silvestres donde fueron reintroducidas (Parque Nacional del Valle del Silencio y Pomudi), en la India, como corroboraron los datos colectados en los años sucesivos, indicando que *Ipsea malabarica* no es altamente específica de un hábitat y puede ser conservada efectivamente durante su reintroducción en algunas localidades. En éstos procesos puede ayudar si las plantas son introducidas en la estación del monson que ocurre de junio a agosto con el mínimo disturbio del suelo y las especies asociadas (Gangaprasad, *et al.*, 1999).

En México Martínez en 1991 liberó plantas de *Oncidium stramineum* en Huatusco, Veracruz y registró un promedio general de 40% de sobrevivencia de plantas liberadas en tres fechas. El sustrato utilizado (ramas y tallos) fueron de 5 tipos: dos silvestres o nativas (*Quercus sp.* y *Yuca sp.*) y tres introducidas en la región (*Citrus sinensis*, *Inga sp* y *Mangifera indica*). En los tallos de *Inga sp* no hubo sobrevivencia, mientras que en los otros cuatro tipos de sustrato no se observaron problemas de adherencia y crecimiento, probablemente éste rechazo esté relacionado con la ausencia de líquenes y otras epífitas en la corteza, aunque se observaron algunas epífitas (orquídeas y bromelias) en las bases de las primeras ramificaciones de éstos árboles, en los sustratos en que sí se fijaron las raíces de las plantas se apreció la presencia de líquenes. Las plantas de *Lycaste skinneri* y *Oncidium stramineum* se consideró adecuado reintroducir plantas de 10 a 20 cm de longitud como un tamaño adecuado, permitiendo liberar un número mayor en un tiempo menor, además de que el utilizar tallas mayores incrementaría el costo por planta. Es importante la aclimatización tomando en cuenta los diferentes factores que interfieren con la sobrevivencia de las plantas en edades más prematuras, pero tarde o temprano por selección natural solo un porcentaje de plantas serán las que lleguen al estado adulto y dejen descendencia fértil (Martínez, 1991). Con la orquídea *Paphiopedilum rothschildianum* las plantas seleccionadas para la reintroducción experimental, tuvieron una longitud de 10 a 28 cm con raíces bien desarrolladas (Grell, *et al.*, 1988).

Con el exitoso establecimiento reportado con *I. malabarica* esta se suma a un pequeño y selecto grupo de especies incluyendo *Paphiopedilum rothschildianum* (Rchb.f. ) Stein (Grell, *et al.*, 1988), *Epidendrum ilense* (Dodson, 1981) y *Bletia urbana* (Rubluo, *et al.*, 1989) de plantas cultivadas *in vitro* e introducidas a sus hábitats naturales exitosamente lo que ha sido demostrado sucesivamente. No muchos trabajos mencionan el número de estructuras y edad de la planta que consideraron más adecuado para la introducción, aunque se menciona que no se puede generalizar ya que cada especie, tiene un desarrollo distinto a otra, dentro de las orquídeas éstos son muy variables, los tiempos de germinación, el crecimiento y desarrollo de estructuras son diferentes de una especie a otra.

#### 2.7.2.2 Periodo de adaptación en campo

El periodo de adaptación de las plantas a condiciones naturales varía según la especie, Martínez (1991) hace una investigación a los seis meses de liberación y otros posteriores de uno, dos y tres años, encontrando aún la presencia de las plantas reintroducidas vivas. En trabajos con *Lycaste skinneri*, *Laelia aromática* y *Oncidium stramineum*, la adaptación llegó a ser de hasta un año. Las plantas liberadas de *Oncidium stramineum*, parte se perdieron posiblemente por herbivorismo de larvas de lepidópteros, las cuales fueron observadas en gran cantidad adheridas en ramas y troncos de los árboles, mientras que algunas plantas sólo presentaron pequeñas heridas (Martínez, 1991).

En la reintroducción de *Paphiopedilum rothschildianum* la evaluación de sobrevivencia se hizo a los ocho meses considerándola muy exitosa (Grell, *et al.*, 1988).

### 2.7.3 Factores físicos que participan en la aclimatación en campo de las plantas

#### 2.7.3.1 Humedad y temperatura

En los trabajos de reintroducción de *Oncidium stramineum*, se menciona que respecto a la humedad, a ninguna de las tres especies liberadas se les regó en el momento de la plantación o posterior a ésta. En la mayoría de los casos existía humedad en el ambiente y sustrato en el momento de la liberación. Es posible que la mejor época de liberación de las plantas pueda ser en el verano y cuando las lluvias se han establecido, debido a que los hábitats presentan las condiciones más adecuadas en humedad y temperatura, aunque

probablemente sean más susceptibles a la abundante presencia de sus depredadores en las estaciones de lluvias (verano y otoño) (Martínez, 1991).

En plantas liberadas de *O. stramineum*, en el estado de Veracruz se observó una sequía muy larga con lluvias muy tenues en la primavera (abril y mayo) en los dos años posteriores a la liberación de las plantas. A un año de liberadas algunas plantas se encontraron muertas por deshidratación sin mostrar daños mecánicos por

herbivorismo, éstas eran plantas con más de 10 cm de largo, con crecimiento de raíz y adherencia al sustrato (rama). Plantas del género *Oncidium*, después de un año de liberadas en campo, presentaban en las hojas una coloración café-rojizo, la coloración es también común observarla en las plantas silvestres que crecen en ésta región. Este efecto puede ser respuesta al estrés de la época de sequía (diciembre-mayo) en que pueden presentarse algunos días o incluso 1 o 2 semanas sin lluvias relevantes, además de manifestarse las temperaturas más bajas de todo el año (temperatura mínima registrada 12° C y máxima 26-28°C en el mes de mayo) (Martínez, 1991).

#### 2.7.3.2 Iluminación

En la reintroducción de *Oncidium stramineum*, en julio de 1989, fue muy notoria la inhibición del crecimiento de las plantas sujetas a mayor intensidad luminosa (orientadas al sur), éstas a pesar de haber sobrevivido por dos años presentaron un crecimiento muy lento en comparación con las orientadas hacia el norte. Las que no recibían luz directa en forma prolongada presentaron tallas superiores de crecimiento con respecto a las plantas sujetas a intervalos de 3 a 5 h de luz directa (Martínez, 1991).

#### 2.7.4 Transplante a campo

Es importante observar el efecto del aire en las plantas de las zonas naturales, la dirección y el sentido en que las corrientes de aire fluctúan, para poder ubicar las plantas de forma que tengan una buena ventilación pero que no estén expuestas a corrientes demasiado fuertes que pudieran causarles daños mecánicos en su estructura además de desecarlas o tirarlas de las ramas de los árboles. Por lo anterior se debe hacer una inspección cuidadosa para colocarlas en la misma dirección en la que se encuentran las colonias silvestres, buscando las corrientes más benéficas para las mismas.

### 2.8 CONSERVACIÓN

Para la utilización y conservación de los recursos naturales de cualquier región o país es necesario, el tener un inventario lo más completo posible de los recursos existentes. El estudio de la flora mexicana ha sido motivo de gran interés científico nacional e internacional (Gómez, 1985 y 1998).

Debido a su posición geográfica y características topográficas, México tiene una de las floras más interesantes y ricas del mundo (Hágsater y Soto, 1998).

Las exploraciones botánicas que se han llevado a cabo en nuestro país desde el siglo pasado han permitido tener inventarios y estudios de grupos taxonómicos muy diversos.

Entre todos los recursos silvestres vegetales de nuestro país, destacan algunos grupos de plantas entre ellos se encuentra la familia de las orquídeas, que por su gran cantidad de especies, diversidad y belleza de sus flores ha sido muy favorecida desde el punto de vista del interés por su estudio (Gómez, 1985).

La conservación de orquídeas es una tarea extraordinaria en los países tropicales por su alta diversidad. El origen del problema es un incremento de las poblaciones humanas demandando progresivamente grandes cantidades de recursos. Desde entonces la mayoría de los países tropicales presentan severos problemas económicos y usualmente tienen una población multi-étnica con diferentes ideas y tradiciones en el uso de recursos naturales, esto lo hace muy complicado para planear el uso de la tierra, y el mantenimiento de la sobrevivencia de las plantas. El primer paso es reconocer que el problema es extremadamente complejo, y que éste requiere del entendimiento y las capacidades de muy diferentes personas, las más preparadas y comprometidas en el uso y la preservación de las orquídeas (Hágsater y Soto, 1998).

En México, los siguientes puntos son importantes y muchos esfuerzos han de conducir a entenderlos y cumplirlos:

- 1) La falta de conocimientos y exacta información sobre la distribución y diversidad de orquídeas.
- 2) La falta de información precisa acerca de la conservación del estado de las especies.
- 3) La política histórica de apertura de tierra silvestre para la agricultura, el desarrollo y consecuentemente, la falta de conciencia para la conservación de la biota.

- 4) La importancia de investigación básica en ¿cómo preservar?
- 5) La importancia de la horticultura como un tratamiento y una estrategia para la conservación *ex situ*.
- 6) La importancia de la colaboración con autoridades gubernamentales y no gubernamentales (ONG's)
- 7) La conservación *in situ* es mucho más importante que la conservación *ex situ*.
- 8) Las orquídeas son un recurso natural del país, éste puede ser explotado, preferentemente por las personas de la localidad en una forma sustentable (Hágsater y Soto, 1998).

Además de inventariar y evaluar los taxa, una de las acciones prioritarias es desarrollar planes para la conservación de la diversidad de especies de orquídeas, especialmente de aquellas que han sido declaradas amenazadas o en peligro de extinción. Los investigadores aseguran que la causa principal de que muchas especies hayan sido declaradas en algún estado de riesgo, es la pérdida de sus hábitats naturales causada por la destrucción de bosques para abrir paso principalmente a la agricultura. Por ello, comenta el ingeniero Hágsater, “la estrategia más importante es la preservación del hábitat. Las prioridades para preservar estos ambientes naturales deben estar dictadas por la riqueza de especies y endemismos de un determinado hábitat”. Como estas dos condiciones pueden variar en magnitud, en tipo de amenaza y en condiciones económicas y sociales, las estrategias de conservación tienen que ser manejadas a nivel nacional y regional.

Por su parte Soto (2005) asegura que “las orquídeas se concentran generalmente en áreas muy específicas, que son importantes por la riqueza y diversidad de sus poblaciones o por sus endemismos.

Se estima que en México existen seis áreas muy diversas, con menos de 100,000 ha cada una, localizadas en diferentes regiones florísticas del país, las cuales poseen 50% del total de orquídeas registrado y que representan tan sólo 0.003% del territorio mexicano. Es muy importante identificar y conocer muy bien dichos centros y enfocar hacia ellos los planes de conservación”.

([www.conabio.gob.mx/institucion/conabio\\_espanol/doctos/orquidea.html](http://www.conabio.gob.mx/institucion/conabio_espanol/doctos/orquidea.html)).

Además, es necesario impulsar el cultivo y propagación, especialmente de las especies que por ser de gran interés hortícola en la actualidad cuentan con escasas poblaciones, debido a la colecta inmoderada que han sufrido en el pasado, ([www.conabio.gob.mx/institucion/conabio\\_espanol/doctos/orquidea.html](http://www.conabio.gob.mx/institucion/conabio_espanol/doctos/orquidea.html)).

La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos naturales, I.U.C.N. (por sus siglas en inglés) edita periódicamente el Libro Rojo de Datos con las categorías de alteración de las especies, en forma individual de los hábitat naturales y se aplican tanto para la fauna como para la flora, este libro es una importante herramienta de consulta para saber la situación de las especies estudiadas y si su situación se agrava o no incluso nos permite tomar medidas de prevención a corto y a largo plazo para la conservación (Martínez, 1991).

La especie de orquídea *Prosthechea vitellina* se encuentra incluida en la Norma Oficial Ecológica 059 (NOM-ECOL-059-2001) como sujeta a “**PROTECCIÓN ESPECIAL**”.

Pr = sujeta a protección especial: Son aquellas especies o poblaciones que podrían llegar a encontrarse amenazadas por factores que inciden negativamente en su viabilidad, por lo que se determina la necesidad de propiciar su recuperación y conservación o la recuperación y conservación de poblaciones de especies asociadas (Esta categoría puede incluir a las categorías de menor riesgo de la clasificación de la IUCN) (NOM-ECOL-059-2001) (<http://semades.jalisco.gob.mx/site/nom059eco/2001.htm>).

### 2.8.1 PROBLEMÁTICA Y JUSTIFICACIÓN

*Prosthechea vitellina* (Lindley) W. E. Higgins tiene una importancia hortícola considerable por su demanda en el extranjero y en el mercado nacional. La destrucción de su hábitat natural, la sobrecolecta indiscriminada de plantas por más de 150 años y la explotación comercial de sus inflorescencias la ha llevado al grado de estar sujeta a protección especial para disminuir su amenaza de extinción (NOM-ECOL-059-2001). Un gran número de poblaciones de México han desaparecido debido a ésta sobrecolecta (Ramírez, 1990).

De acuerdo a la revisión de literatura científica realizada en éste trabajo existe un escaso conocimiento de la biología de esta especie y en particular se desconoce totalmente el proceso de su germinación y el desarrollo ontogénico del embrión hasta la formación de una planta completa.

Han existido intentos infructuosos de propagación no tradicional de esta planta (Ramírez, 1990) mediante el cultivo asimbiótico de semillas en los cuales quedó de manifiesto que la fase de aclimatación *ex vitro* en invernadero es el paso crítico de la micropropagación, ya que los reportes indican la muerte del 100 % de las plantas durante este procedimiento (Hussey, 1986 y Ramírez, 1990).

En general es difícil lograr la aclimatación de plantas de orquídeas obtenidas *in vitro* ya que no se pueden extrapolar o trasponer procedimientos de una especie a otra ya que sus requerimientos son diferentes y existen factores ambientales microclimáticos muy particulares que determinan su desarrollo, por lo que para conocerlos se requiere hacer estudios específicos y practicar numerosas pruebas (sustratos, nutrición, iluminación, variación térmica, hidratación, ventilación, entre otras).

Lograr, mediante la investigación que se genere el conocimiento acerca de la germinación *in vitro* de *Prosthechea vitellina* y que las plantas generadas de forma masiva se puedan aclimatizar exitosamente, permitirá la obtención de grandes cantidades de plantas, las cuales pueden utilizarse en estrategias de ecorehabilitación para disminuir las presiones que existen sobre las poblaciones naturales de esta especie.

Por todo lo anterior es clara la necesidad de generar conocimientos científicos de la biología reproductiva y desarrollo *ex vitro* de la orquídea *Prosthechea vitellina*.

Bajo este marco conceptual el presente estudio tuvo como propósito establecer las condiciones para la germinación asimbiótica y el desarrollo *in vitro* de semillas de *Prosthechea vitellina*, además de determinar las condiciones para el desarrollo de las plántulas *in vitro* así como de la aclimatación a invernadero.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 GENERAL

Establecer un protocolo de la micropropagación de *Prosthechea vitellina* y de la adaptación a condiciones ambientales de las plantas obtenidas.

#### 3.2 PARTICULARES

- ❖ Germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de *Prosthechea vitellina*.
- ❖ Caracterizar el desarrollo morfológico de las plántulas, durante la germinación *in vitro*.
- ❖ Establecer el procedimiento para la aclimatización de las plantas a condiciones de invernadero.
- ❖ Liberar en campo plantas y determinar su comportamiento en condiciones naturales.

## 4. METODOLOGÍA

El trabajo de investigación se dividió en tres fases: Fase de laboratorio, fase de invernadero fase de campo.

### 4.1 FASE DE LABORATORIO

#### 4.1.1 Material biológico

El material biológico que se utilizó fueron semillas de tres cápsulas no dehiscentes y sanas provenientes de plantas de *Prosthechea vitellina* colectadas en el mes de enero del 2003 en un bosque nublado de pino-encino en Huauchinango, Puebla. Las cápsulas colectadas fueron almacenadas para su conservación en un desecador con cloruro de calcio anhidro y en refrigeración a una temperatura de 7 °C durante dos días. Para obtener las semillas de las cápsulas no dehiscentes se retiraron los restos florales, se lavaron con agua corriente y se introdujeron a la campana de flujo laminar en condiciones de asepsia.

Cada cápsula se desinfectó exteriormente sumergiéndola en etanol al 70%, durante 10 minutos. En una caja de petri estéril, se abrió la cápsula con un bisturí haciendo un corte longitudinal liberando las semillas cuidadosamente con una espátula, se colocaron en un vial bien tapado dentro del desecador y en refrigeración, para conservarlas en las mejores condiciones y libres de contaminación. Se realizaron las pruebas de viabilidad con cloruro de trifenil tetrazolio (TTC) a tres lotes de semillas de cada una de las cápsulas colectadas.

#### 4.1.2 Viabilidad de las semillas

Se separaron lotes de semillas provenientes de tres cápsulas colocando (100 a 200) en pequeños sobres de papel filtro, humedeciéndolos con agua destilada estéril y sumergiéndolos en 20 ml de solución de etanol al 70% por 10 minutos (para disolver ceras que pudieran estar en la superficie de las semillas) con agitación suave y continua. Se lavaron con agua destilada estéril tres o cuatro veces hasta haber eliminado el etanol, sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0.6% v/v con una gota de jabón líquido, se agitó constantemente durante 15 minutos, al término de los cuales se lavaron con agua destilada estéril hasta que se eliminó el cloro. Cada sobre se colocó en una caja de petri y se humedeció con una solución de cloruro de tetrazolio al 0.1% se envolvió la caja con papel aluminio para mantenerlas en oscuridad por un periodo de 24 a 48 horas, al término de éste tiempo se observaron las semillas en un microscopio estereoscópico y se evaluó el grado de tinción de los embriones, se contaron y se registró el número de semillas teñidas, no teñidas y vanas, se hicieron tres repeticiones del conteo de cada lote (300 semillas aprox.) se sacaron los porcentajes y se estableció la viabilidad.

#### 4.1.3 Medio de cultivo Murashige – Skoog (1962).

Para la siembra *in vitro* de semillas y plántulas de *Prosthechea vitellina* se utilizó el medio nutritivo MS (1962) (SIGMA-M5524-10 L. Lot. 73K244311) [Apéndice 1]. Para cada litro de medio se pusieron 800 mL agua destilada con agitación continua, se agregaron 4.3 g sales basales MS (macro y micronutrientes), 0.4 mg de tiamina, 0.5 mg de niacina y 0.1 mg de piridoxina, 100 mg de Myo-inositol y 30 g de sacarosa hasta disolución, se aforo a un litro y se ajustó el pH a 5.7, se agregaron 6 g de agar y se calentó hasta ebullición para disolverlo, se vació el medio caliente en recipientes de vidrio con tapa y se esterilizaron en autoclave 121°C a 1.5 Kg/cm<sup>2</sup> de presión durante 20 min.

#### 4.1.4 Desinfectación y siembra de semillas *in vitro* en medio de cultivo

Para asegurar las condiciones de asepsia se efectuó el procedimiento de la siembra en la campana de flujo laminar. Previo al procedimiento de siembra se limpió la campana con etanol al 70%, todo el material quirúrgico que se utilizó se esterilizó en la autoclave y se flameó con etanol al 70%.

Las semillas se separaron en lotes de 100 a 200 semillas y se colocaron en pequeños sobres de papel filtro. En un vaso de precipitado se colocaron los sobres humedeciendo con agua destilada y se sumergieron en 20 ml de solución de etanol al 70% por 10 min, agitando constantemente, se enjuagaron con agua destilada estéril tres o cuatro veces hasta eliminar el etanol, luego se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0.6 % v/v con una gota de jabón líquido, durante 15 min. Nuevamente se lavaron tres o cuatro veces con agua destilada estéril hasta eliminar el cloro y se eliminó el exceso de agua. Se transfirió un sobre en cada



frasco con medio de cultivo MS se extendió sobre el medio, se flameó y se tapó perfectamente el frasco. Se colocaron los frascos sembrados en la cámara de incubación con un foto-periodo de 16 horas luz por 8 de oscuridad a una temperatura de 23 °C (Fig. 4).

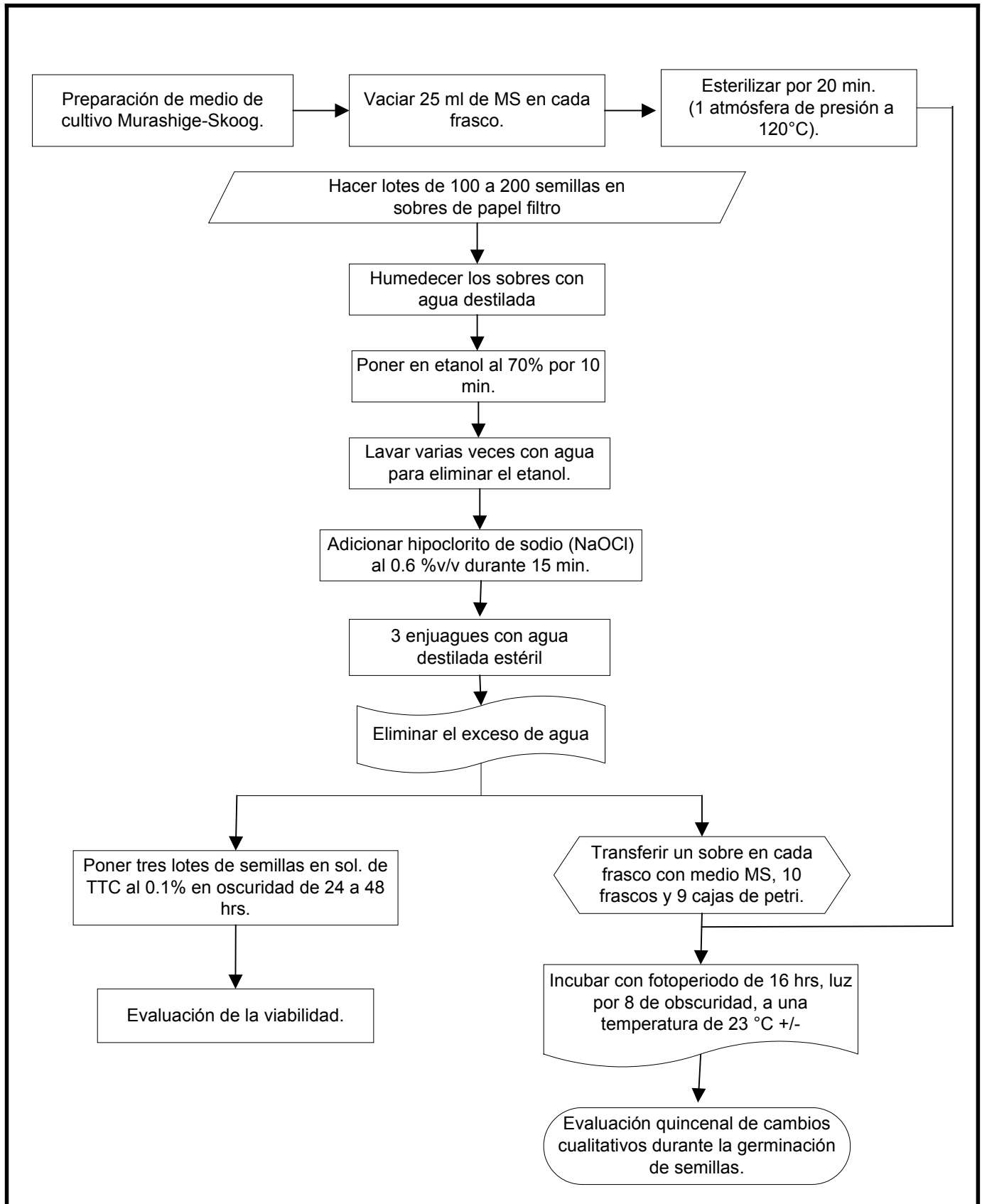


Fig 4. Diagrama de procedimiento de desinfección, pruebas de viabilidad y siembra de semillas *in vitro*.

#### 4.1.5 Germinación y desarrollo *in vitro*

La germinación en las orquídeas comprende varios estadios en los que se presentan cambios morfológicos importantes en el embrión que indican el inicio y avance del crecimiento y diferenciación de las estructuras que darán lugar a una planta completa. En ocasiones se presentan las primeras etapas del proceso de germinación pero éste se detiene en algún estadio por alguna(s) circunstancia(s) que no permite que la formación de la planta llegue a término, en este caso se considera que el embrión no germinó. La germinación inicia desde que el embrión de la semilla se hincha debido a que se embebe de agua, paulatinamente se presentan distintos eventos considerados como parte de éste proceso como la formación del protocormo, la aparición de primordios foliares y de la aparición de la primera raíz, cuando esto sucede se asume que tuvo lugar la germinación. A continuación se mencionan los distintos eventos que se observan durante el proceso de la germinación.

- 1.-Semilla.
- 2.-Hinchamiento de la semilla y cambios de coloración del embrión.
- 3.-Rompimiento de la testa.
- 4.-Desarrollo de pelos absorbentes en la epidermis.
- 5.-Formación de protocormo.
- 6.-Aparición de primordio foliar que bosqueja las primeras hojas.
- 7.-Aparición de rizoides precursores de las raíces.
- 8.-Planta completa.

Se llevó registro de la germinación, haciendo una revisión quincenal, evaluando durante 280 días los cambios cualitativos que se observaron en la estructura de las semillas y plántulas.

##### 4.1.5.1 Desarrollo de las plantas *in vitro*.

Después de germinadas las semillas, se siguieron revisando los frascos semanalmente para registrar el avance del desarrollo de las plantas durante seis meses, abriendo un frasco una vez por mes,. Observando las plantas se registró el desarrollo por medio de la evaluación de los siguientes parámetros: Número y longitud de las hojas y raíces, longitud total de la planta. dimensiones del pseudobulbo (ancho y largo) en caso de haberlo, se hizo un registro fotográfico del desarrollo de *Prosthechea vitellina* para documentar la secuencia del mismo. Posteriormente las resiembras periódicas (cada dos meses), en medio de cultivo fresco MS para el crecimiento de las plántulas. Se individualizaron las plantas en tubos de ensayo hasta que presentaron más de dos estructuras foliares y radicales, que se apreciaran vigorosas con una longitud total mayor a 1.5 cm que permitió iniciar su adaptación a condiciones *ex vitro*.

## 4.2. FASE DE INVERNADERO

### 4.2.1 Preacondicionamiento de las plantas para la siembra

Se llevó al invernadero un lote de 90 plantas *in vitro* para iniciar su preadaptación a las condiciones de invernadero por tres o cuatro semanas previo al trasplante con sustrato. Al término de éste tiempo se sembraron *ex vitro* tanto las 90 plantas de invernadero como 90 plantas más provenientes de la cámara de incubación para establecer qué ruta resulta más favorable para iniciar la aclimatización y desarrollo de las plantas y así evitar un doble estrés por el cambio de condiciones de la cámara de incubación al invernadero y el cambio del medio de cultivo al nuevo sustrato. Se dividió el número total de plantas en tres lotes de 30 plantas cada uno de los tratamientos de preacondicionamiento y cada lote se sembró en una mezcla de sustratos diferente, preparada con sustratos apropiados para orquídeas, esto con el fin de establecer la mezcla más favorable para *Prosthechea vitellina* y que se describen en el siguiente apartado.

Como las plantas estaban completas y bien desarrolladas pero no tenían un tamaño uniforme se clasificaron en tres rangos distintos: Rango 1 (de 1 a 2.5 cm), Rango 2 (de 2.6 a 4 cm), Rango 3 (de 4.1 a 15 cm), de acuerdo a la longitud total de éstas y se trasplantó un rango en una mezcla de sustrato. Las plantas se trasplantaron con el siguiente método: Se sacaron las plantas de los tubos y se enjuagaron con agua destilada eliminando perfectamente los restos de medio de cultivo, eliminando las hojas o raíces muertas. Se sumergieron en solución de fungicida benlate al 1% + fertilizante folifértil al 1% durante 20 minutos, como medida de prevención a la aparición de hongos debida a la alta humedad y de nutrición, después se transfirieron a la mezcla de sustratos correspondiente, se humedeció la mezcla parcialmente con la misma

solución, se llevaron al invernadero las plantas del lote preacondicionado en invernadero y se colocaron en un lugar bien sombreado y ventilado, y a la cámara las que provenían de la misma.

#### 4.2.1 Sustratos para siembra *ex vitro*

Se utilizaron cuatro materiales distintos para orquídeas epífitas: Esfagnum, agrolita, corteza de encino y carbón activado, lavándolos perfectamente con agua corriente, se les dejó escurrir el exceso de agua. Después de eliminar el exceso de agua se esterilizaron autoclave (120 °C a 1.5 Kg/cm<sup>2</sup> de presión durante 60 minutos). Composición de las tres diferentes mezclas:

1. Esfagnum + agrolita + carbón activado (1:1:1).
2. Esfagnum+ agrolita + corteza de encino (1:1:1).
3. Esfagnum + corteza de encino + carbón activado (1:1:1).

#### 4.2.2 Recipientes para trasplante *ex vitro* de plántulas

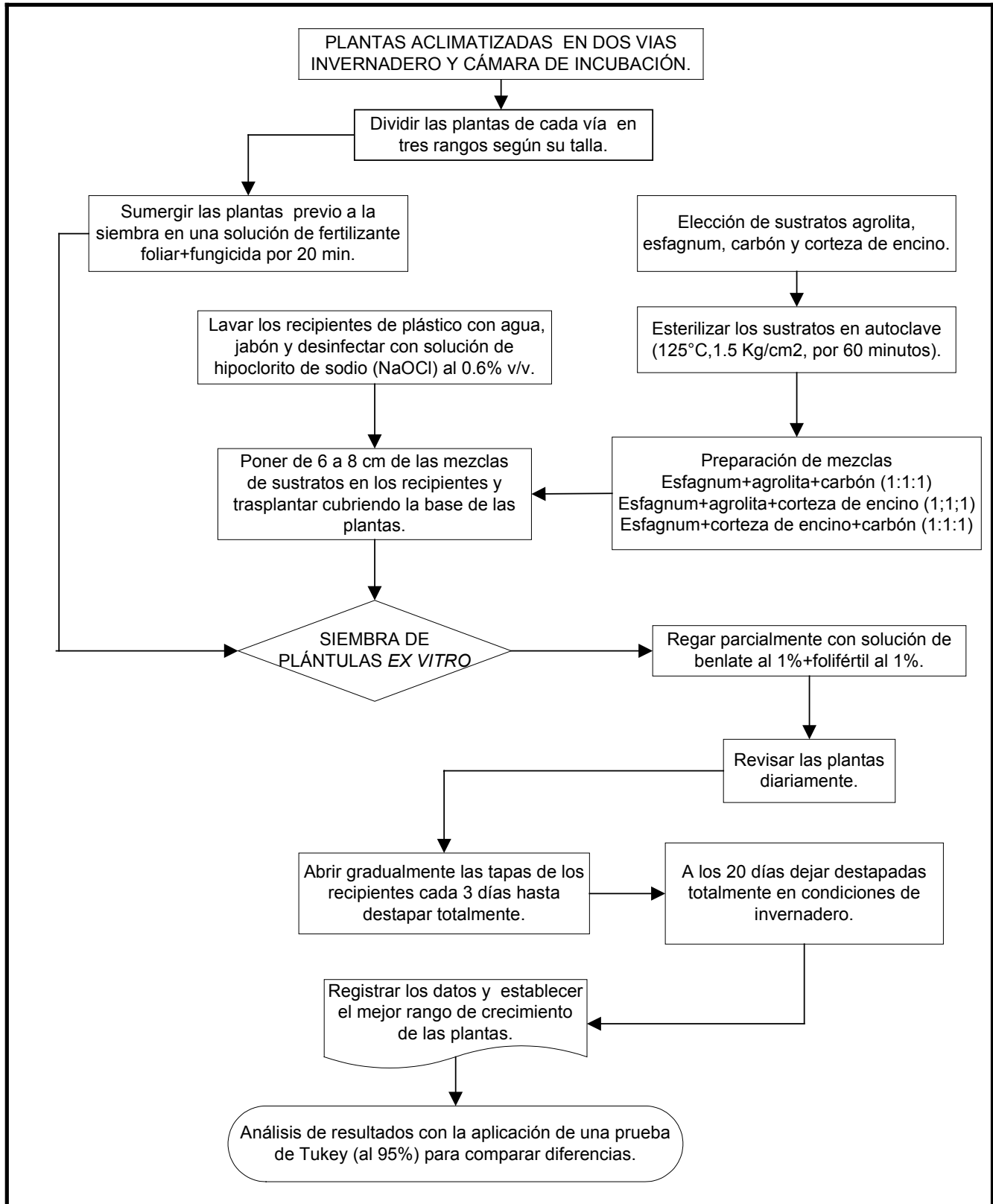
Los recipientes utilizados para la siembra de las plantas fueron botellas medianas de polietileno poliestalato transparente (PET) de 600 mL a las cuales se les hizo un corte parcial transversal a  $\frac{3}{4}$  partes de altura aproximadamente, para poder introducir el sustrato y la planta, se hicieron cuatro o cinco perforaciones en la base de la botella de 1 cm de diámetro, para proporcionar un buen drenaje y aireación. Se lavaron las botellas y las tapas con agua y jabón sumergiéndolas en una solución de hipoclorito de sodio al 6% v/v durante 20 minutos para su desinfección, posteriormente se lavaron con agua corriente hasta eliminar el hipoclorito de sodio.

#### 4.2.3 Trasplante de las plantas a *ex vitro*

En los recipientes con sustrato (una cuarta parte de su volumen aprox), se trasplantaron las plantas se registraron los siguientes parámetros tanto al momento del trasplante como a los seis meses tiempo en que finalizó la prueba: Número y longitud de las hojas, número y longitud de las raíces, longitud total de la planta y dimensiones del pseudobulbo (ancho y largo). Ya trasplantadas las plantas se colocaron las tapas a los recipientes y se mantuvieron en un invernadero con condiciones ambientales naturales de verano y otoño en la ciudad de México, esto es sin control artificial de temperatura y humedad, solamente el control de la ventilación por medio de ventilador eléctrico con un periodo de nueve horas de ventilación durante el día, y el control de la iluminación por medio de una malla obscura que permitió la disminución de luz natural diurna al 50%.

#### 4.2.4 Aclimatización de plantas a condiciones de Invernadero

Para graduar la humedad en los recipientes cada tercer día se abrieron un poco, para que las plantas perdieran humedad paulatinamente y se adaptaran a las condiciones de humedad del invernadero. Diariamente se revisaron las plantas para detectar algún síntoma causado por contaminación o plagas, el riego se hizo con agua destilada cada tercer día, y cada quince días se aplicó solución de funguicida y fertilizante (benlate al 1 % + folifétil al 1 %). A los diez días de la siembra, se retiraron las tapas permitiendo un contacto parcial con las condiciones de invernadero, a los cuarenta y cinco días se cortaron los recipientes, y quedaron como macetas tradicionales en condiciones de invernadero. Durante los seis meses se registraron los cambios cualitativos de las plantas y sus estructuras, además de las ventajas y desventajas de las mezclas, para determinar cuál de los tres sustratos fue el más adecuado que favorecía la formación de raíces, con la humedad requerida por las plantas, mejor soporte para las mismas, mínima acumulación de sales y de microorganismos perjudiciales para las plantas. Se analizaron los datos obtenidos mediante una Prueba de Tukey (95%) para comparar las diferencias de cada uno de los parámetros registrados al inicio y al término de la prueba de aclimatización entre las plantas preacondicionadas previamente en invernadero y en la cámara de incubación, así como entre las plantas dependiendo del rango de altura (Fig. 5).

Fig 5. Diagrama de la fase de invernadero de *Prosthechea vitellina*.

### 4.3 FASE DE CAMPO

#### 4.3.1 Reintroducción de las plantas en su hábitat natural.

Se llevaron las plantas a un bosque de pino y encino templado lluvioso de donde proceden las plantas madre localizado entre el km 11½ y 13 de la carretera Hueyruapan, en Huauchinango, Puebla a una altitud de 1839 m a una latitud 532,260 latitud norte y 2,081,344 longitud oeste, considerada adecuada para la liberación de plantas de *Prosthechea vitellina*.

Se emplearon como soporte para las plantas segmentos de ramas de encino de 15 a 20 cm de diámetro y de 80 a 150 cm de longitud colectadas en campo, se usaron para la prueba 210 plantas en total, que se dividieron en tres rangos, 70 de cada rango de altura el Rango 1 (de 2.5 a 4.5 cm), el Rango 2 (de 4.6 a 7 cm), el Rango 3 (de 7.1 a 12.5 cm) se distribuyeron sobre las ramas longitudinalmente alternando plantas de los tres rangos para que las condiciones fueran homogéneas se colocaron las raíces de las plantas en bolsitas de manta de cielo y cubiertas con esfagnum las estructuras aéreas de las plantas quedaron al descubierto (Fig. 6). Se numeró y marcó cada planta de cada rango se puso una capa de musgo vivo cubriendo la base de las plantas para protegerlas y para evitar la desecación. De la misma forma que en las pruebas anteriores antes de colocar las plantas en las ramas se les tomaron los mismos parámetros que al inicio de la prueba. Después de trasplantar las plantas a las ramas se mantuvieron por un mes en el invernadero. Se les aplicó solución fertilizante un día antes de liberarlas en campo.

##### 4.3.1.1 Registro de crecimiento y sobrevivencia de las plantas

A los seis meses se hizo una visita a la zona de liberación de las plantas para evaluar del número de plantas, el estado de las mismas y la sobrevivencia. Se recogieron las ramas, haciendo registro fotográfico de las ramas y el estado en que se encontraron, se llevaron al invernadero de la FES Zaragoza y se examinaron minuciosamente.

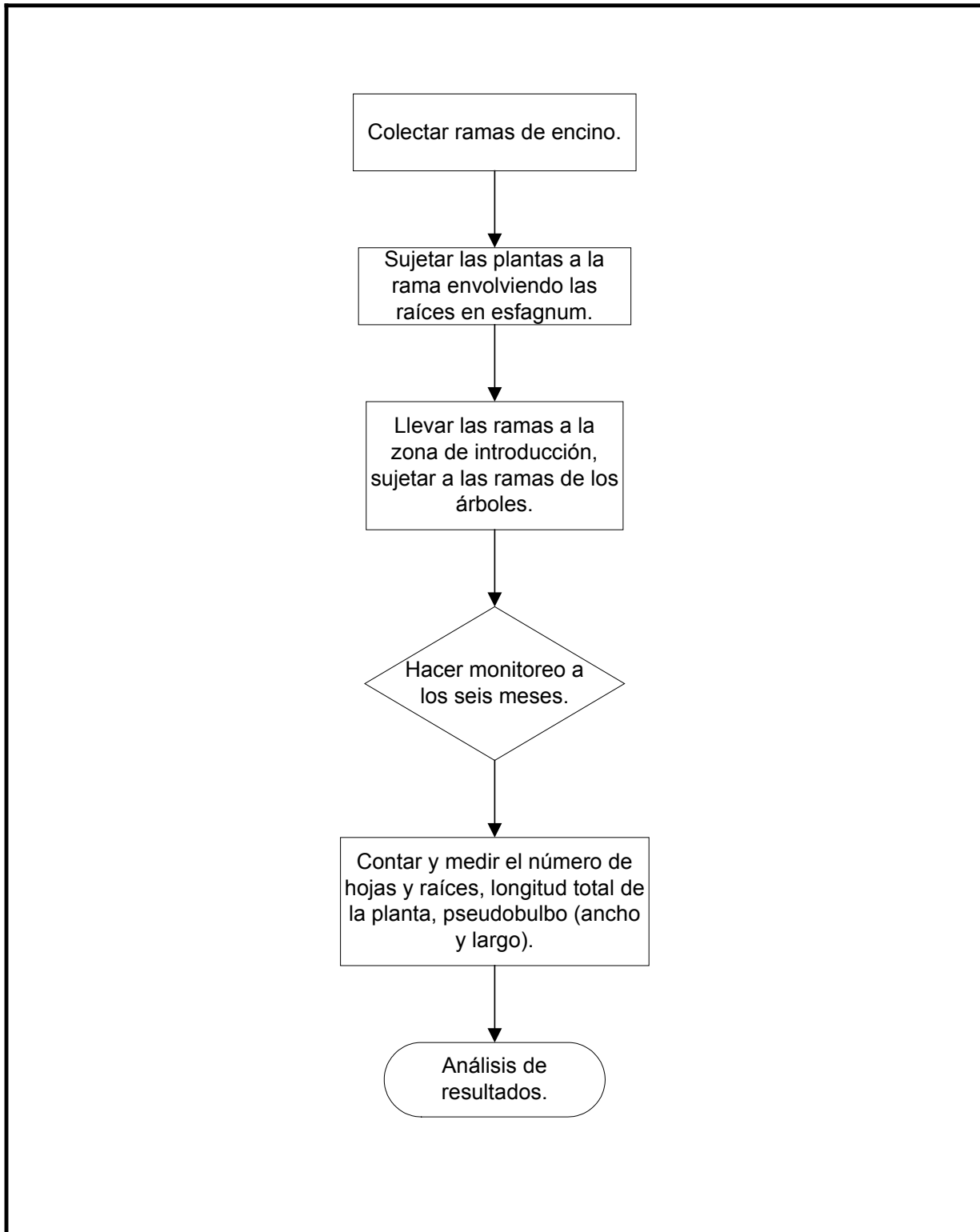


Fig 6. Diagrama de reintroducción de plantas a campo de *Prosthechea vitellina*.

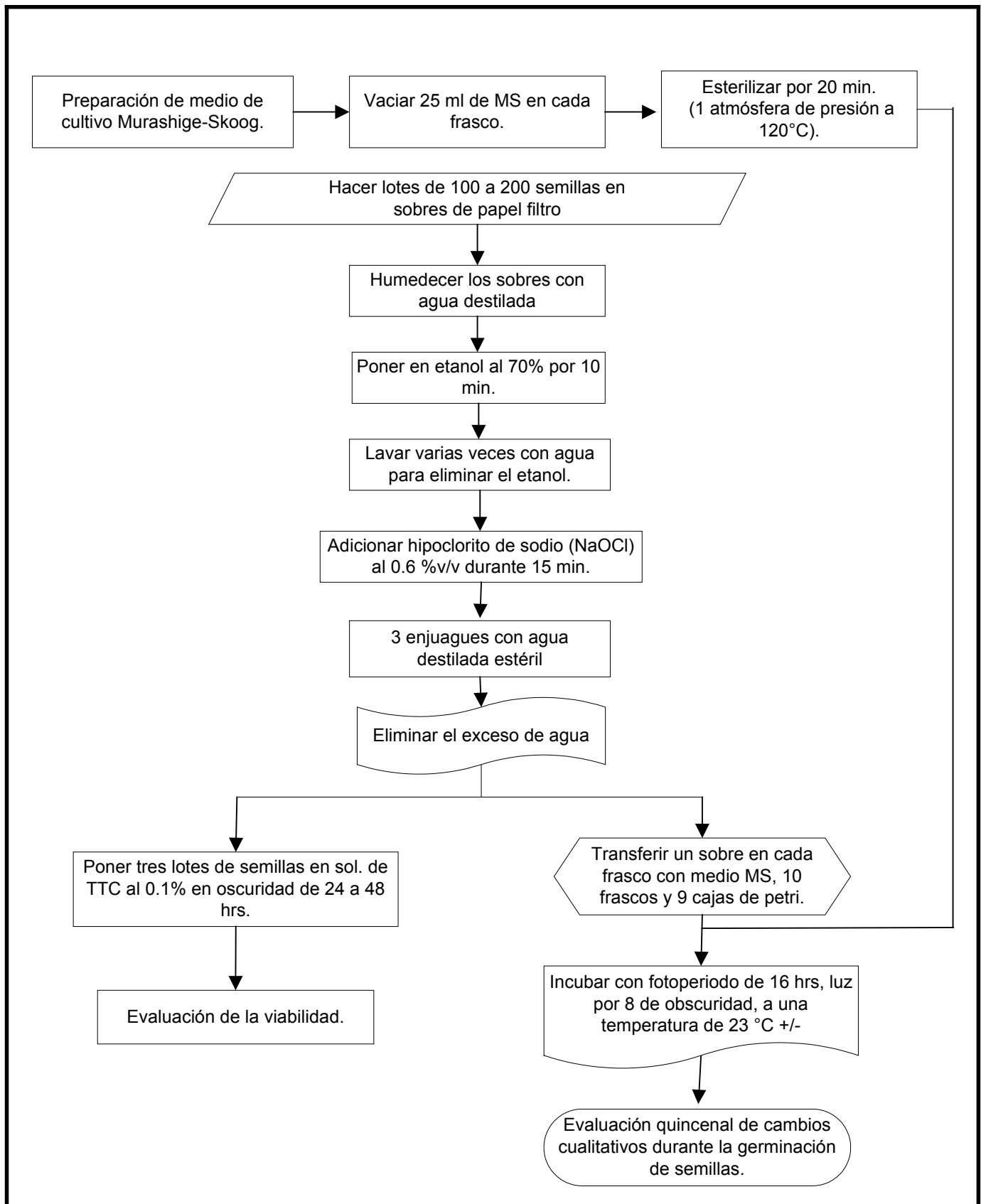
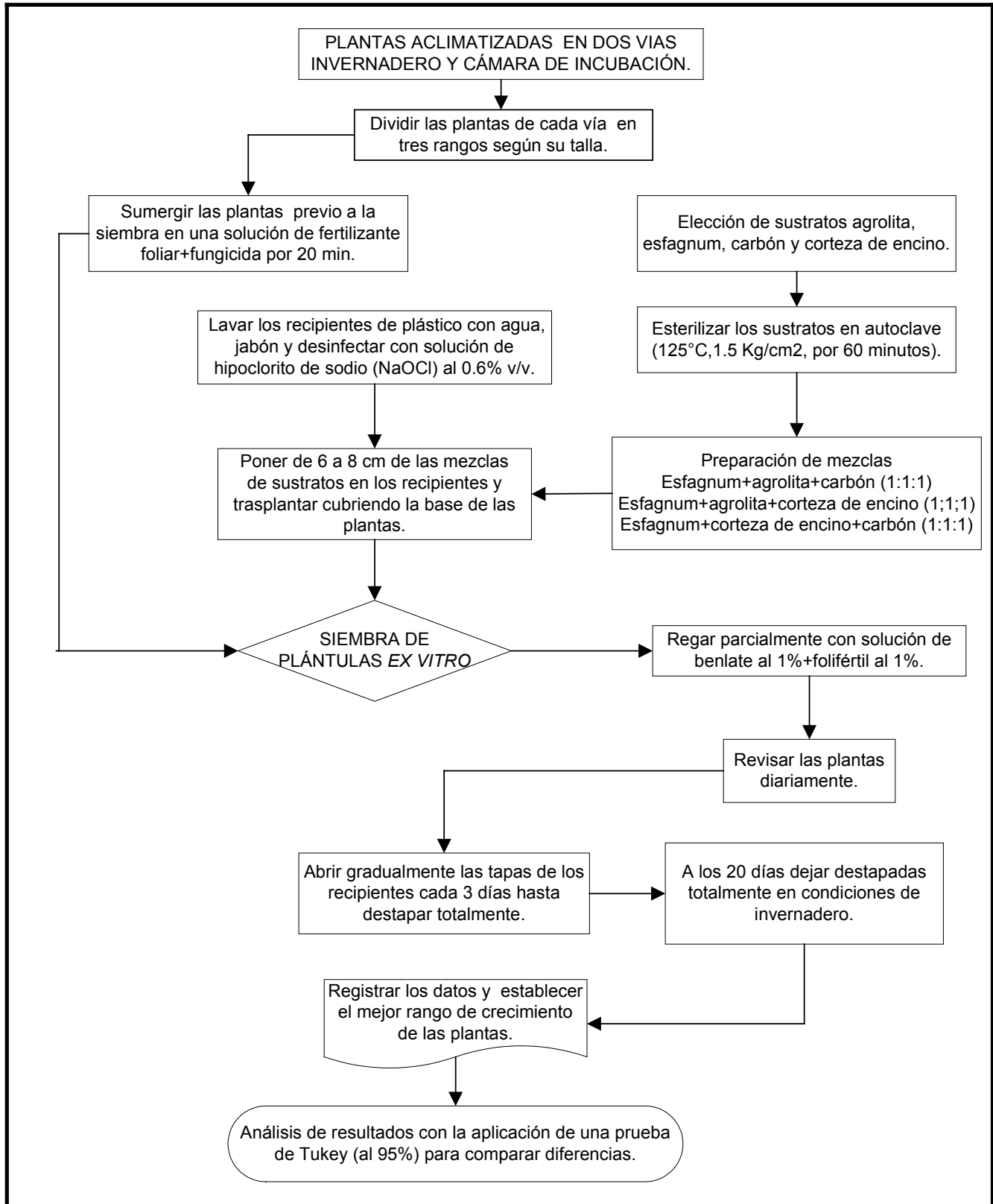


Fig 4. Diagrama de procedimiento de desinfección, pruebas de viabilidad y siembra de semillas *in vitro*.



Fig 5. Diagrama de la fase de invernadero de *Prosthechea vitellina*.

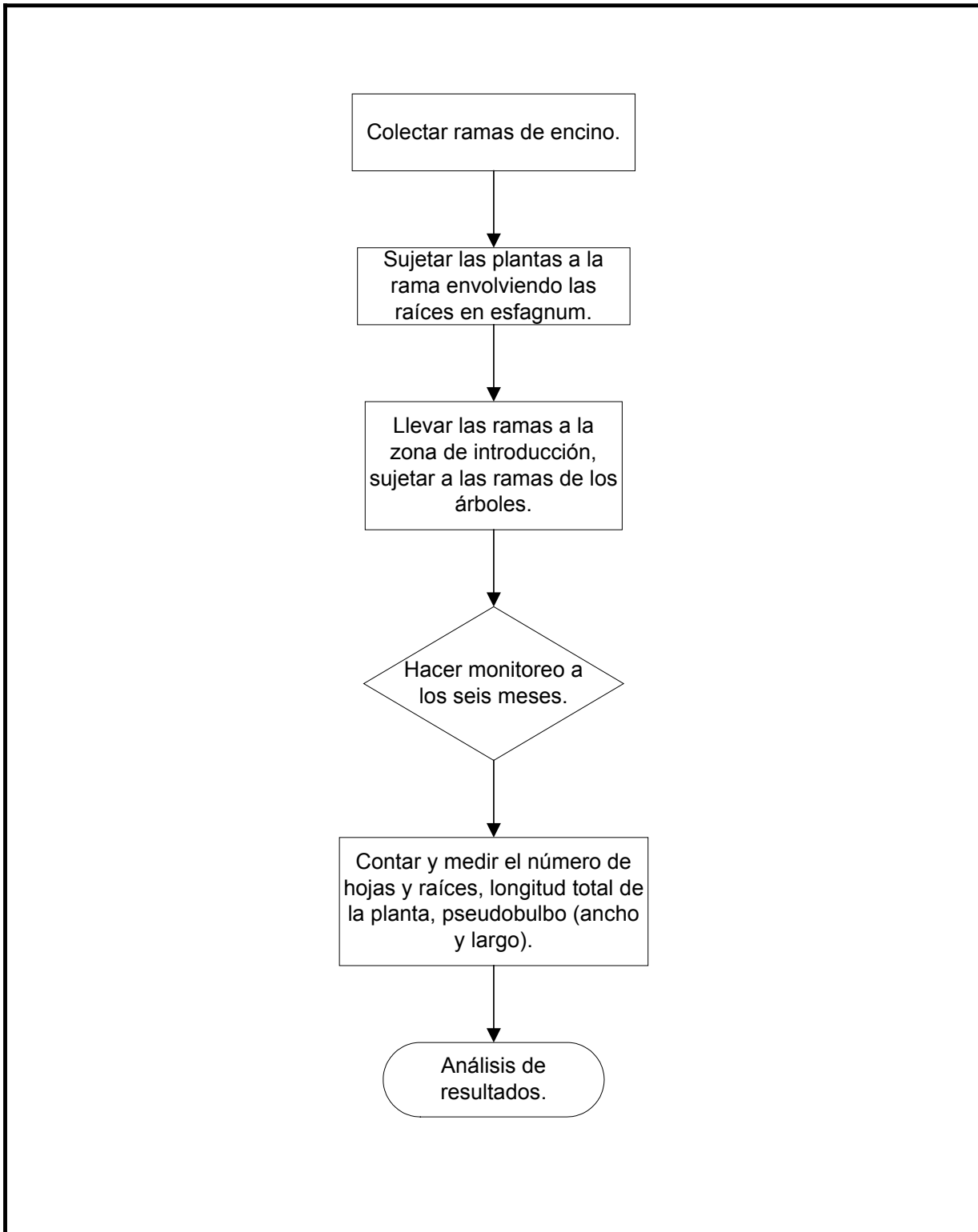


Fig 6. Diagrama de reintroducción de plantas a campo de *Prosthechea vitellina*.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 5.1 Germinación.

#### 5.1.1 Evaluación de la viabilidad.

Al efectuar la prueba de viabilidad a las semillas utilizadas de tres lotes cada uno proveniente de diferente cápsula y después de tres repeticiones de cada uno se estableció para el primer lote un 71% de viabilidad, el segundo tuvo un 70% y el tercero el 21.5% de viabilidad porcentajes que se podrían considerar bajos sin embargo, debido a la gran cantidad de semillas producidas por las cápsulas (cientos de miles) el total de plantas obtenidas fue muy alto.

Al respecto Koopowitz y Thornhill (citados por Hicks, 2000) en un estudio reportan el 95% de viabilidad en semillas de *Encyclia vitellina* después de estar almacenadas 10 años.



Fig. 7. Vista en estereoscopio de una semilla de *Prosthechea vitellina* con embrión (Estadio1).

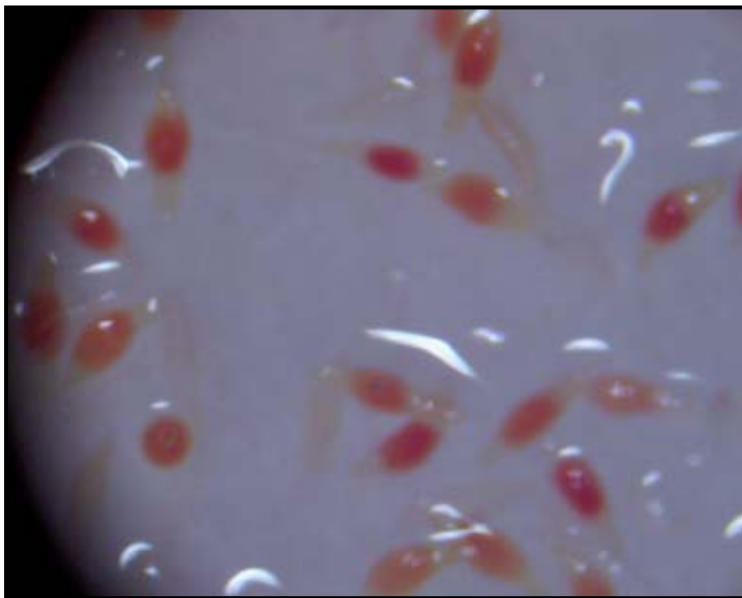


Fig. 8. Vista en microscopio de embriones teñidos de semillas de *Prosthechea vitellina* en TTC.

Es posible que la viabilidad de los lotes utilizados se haya debido a las condiciones de almacenaje (en refrigeración a 7° C) ya que éstos autores reportan que las condiciones de almacenamiento favorables para prolongar la viabilidad de *Prosthechea vitellina* son (de -24°C a -40°) lo que en su experiencia permitió el mantenimiento de una viabilidad más alta.

Las (figs. 7 y 8) ilustran las semillas de *Prosthechea vitellina* bien teñidas, menos teñidas y vanas, tomadas durante las pruebas de viabilidad, así fue como se apreciaron tanto la forma de cada semilla, de los embriones y de la testa observas en el microscopio

### 5.1.2 Desarrollo ontogénico

Debido a las diferencias morfológicas manifestadas durante la germinación, crecimiento y diferenciación del embrión, formación de protocormo, formación de estructuras foliares, formación de raíces y cambios de coloración se estableció en éste estudio que el proceso de germinación asimbiótica *in vitro* de *Prosthechea vitellina* pasa por ocho estadios (cuadro 3) diferentes que son los siguientes:

Cuadro 3.	
Semilla	1
Embrión verde e hinchado.	2
Protocormo fuera de la testa con primordio foliar.	3
Protocormo con una hoja y rizoides.	4
Plántula con dos hojas y una raíz.	5
Plántula con 2-3 hojas y una raíz.	6
Plántula con tres hojas y número de raíces variable.	7
Plántula con 4 hojas y número de raíces variable.	8

Cuadro 3. Descripción de estadios de desarrollo de *Prosthechea vitellina*.

Inicialmente las semillas presentaron un incremento en volumen debido a la captación de agua y nutrientes por el embrión del medio de cultivo (Estadio 1). Las semillas que originalmente presentan una testa color crema con un embrión de color beige más intenso experimentaron a los diez días un cambio de coloración, tornándose el embrión esférico de un color blanquecino a uno de color verde claro (Estadio 2). Éste paulatinamente se tornó a un color verde más intenso debido a la presencia de clorofilas (Fig. 9).



Fig.9. Protocormo de *Prosthechea vitellina* sin testa se observa el polo apical.

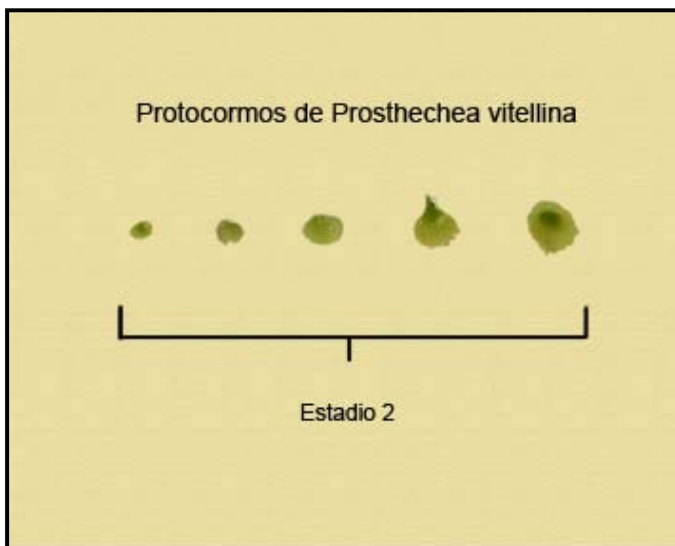


Fig.10. Protocormos de *Prosthechea vitellina*.

Con el incremento de volúmen el embrión fue ocupando el espacio interior de la semilla hasta el momento en que la testa se desgarró permitiendo la salida del embrión, marcando la iniciación del estadio de protocormo.

El protocormo ya libre de la testa incrementó rápidamente su tamaño, adquirió un color verde más oscuro en uno de los polos y la formación de una protuberancia, indicando con esto la ubicación del polo apical y evidenciando posteriormente la zona meristemática vegetativa estadio 3 que daría origen a los 110 días de cultivo, un estadio de desarrollo más avanzado, el protocormo (Fig. 10).

Posteriormente este protocormo presentó la formación de uno o dos primordios foliares los cuales fueron precursores de las hojas verdaderas (Fig. 11).

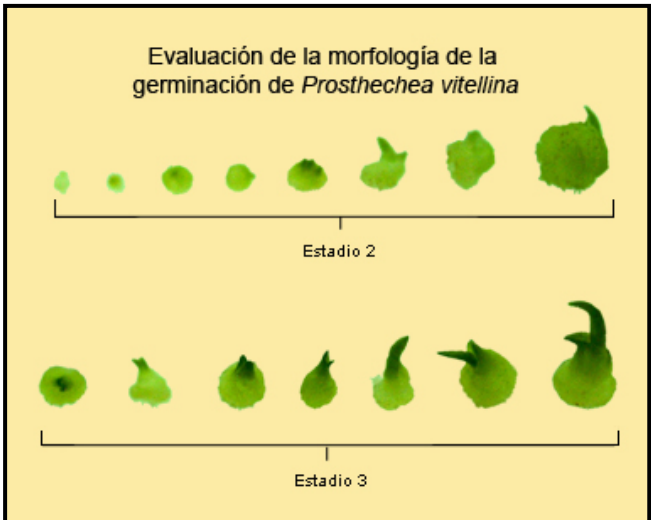


Fig.11. Morfología de la germinación *Prosthechea vitellina* a 110 a 140 días estadios 2 y 3.

En el polo basal se formaron rizoides los cuales precedieron a la formación de las raíces verdaderas del estadio 4 (Fig. 12).



Fig.12. Estadio 4 del desarrollo de *Prosthechea vitellina* a 150 días de sembradas.

En estadios más avanzados (estadio 5) del protocormo se desarrollaron a partir de los primordios foliares las hojas (Figs.13 y 14).

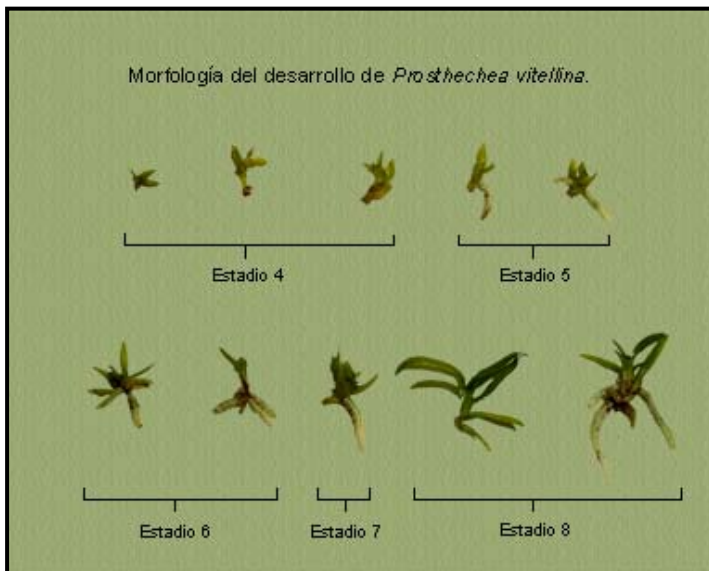


Fig.13. Morfología del desarrollo de *Prosthechea vitellina* estadios 4 al 8.



Fig. 14. Estadio 5 del desarrollo de *Prosthechea vitellina* con una raíz verdadera.

Se estableció como una generalidad que la aparición de la primera raíz verdadera fue siempre posterior al desarrollo de por lo menos dos hojas en los estadios 6 a 8 (Fig. 15).



Fig. 15. Estadio 6 del desarrollo de *Prosthechea vitellina* estadio 5.

Después de la formación de la primera raíz las plántulas generaron más raíces (aparentemente de manera independiente del número de hojas formadas) y no se encontró una relación entre el número de raíces presentes y el número de hojas formadas en cada una de las nuevas plántulas, al llegar a éste punto del desarrollo consideramos que ya se habían formado plantas completas (Figs. 16 y 17).



Fig. 16. Estadio 7 del desarrollo la germinación de *Prosthechea vitellina*.

Con respecto a la presencia de pigmentos clorofílicos en los embriones y protocormos durante el desarrollo *in vitro* Rubluo, *et al.*, (1989) reportan que el color fotosintético de los embriones de *Bletia urbana* cultivados *in vitro* apareció desde los siete días de iniciado el cultivo. Algunos autores Rubluo, *et al.*, (1989); Obaidul, *et al.*, (2000); Padrón, (2006) han reportado la presencia de estructuras aclorofílicas (protocormos y plántulas) las cuales no continuaron su desarrollo.

En *Prosthechea vitellina* no se encontró durante éste estudio ninguna anomalía de pigmentación.

Obaidul, *et al.*, (2000) señalan que los embriones de semillas cultivadas *in vitro* de un híbrido de *Cattleya walkeriana* adquirieron un color verde a los 20 días.

Stemberg y Kane (1998) estudiando la germinación de *Encyclia boothiana* variedad *Erythronioides* y con semillas del género *Cattleya* reportaron que la coloración del embrión depende de la composición del medio de cultivo.

En este estudio los embriones de *P. vitellina* evidenciaron la presencia de clorofilas a los diez días de iniciado el cultivo y manteniéndose esta coloración durante todo su proceso de desarrollo.



Fig.17. Estadio 8 del desarrollo de *Prosthechea vitellina*.

En relación a la velocidad del desarrollo y cambios de fase durante la germinación está reportado que en *Bletia urbana* la formación de protocormos se presenta a los 21 días (Rubluo *et al.*, 1989) y que la formación de raíces es posterior a la formación de hojas como sucede en el género *Vanilla planifolia* (Philip y Nainar, 1988).

Durante el desarrollo ontogénico de *Prosthechea vitellina* en este estudio el cambio de fase de embrión hinchado a protocormo se dio hasta los 110 días y no se observó una velocidad de crecimiento uniforme entre hojas y raíces ya que existían plantas al mismo tiempo con hojas largas y raíces cortas así como hojas cortas y raíces largas, (Fig.18 y cuadro 4) a pesar de que las raíces siempre se formaron después que las hojas como esta reportado en especies del género *Vanilla*.

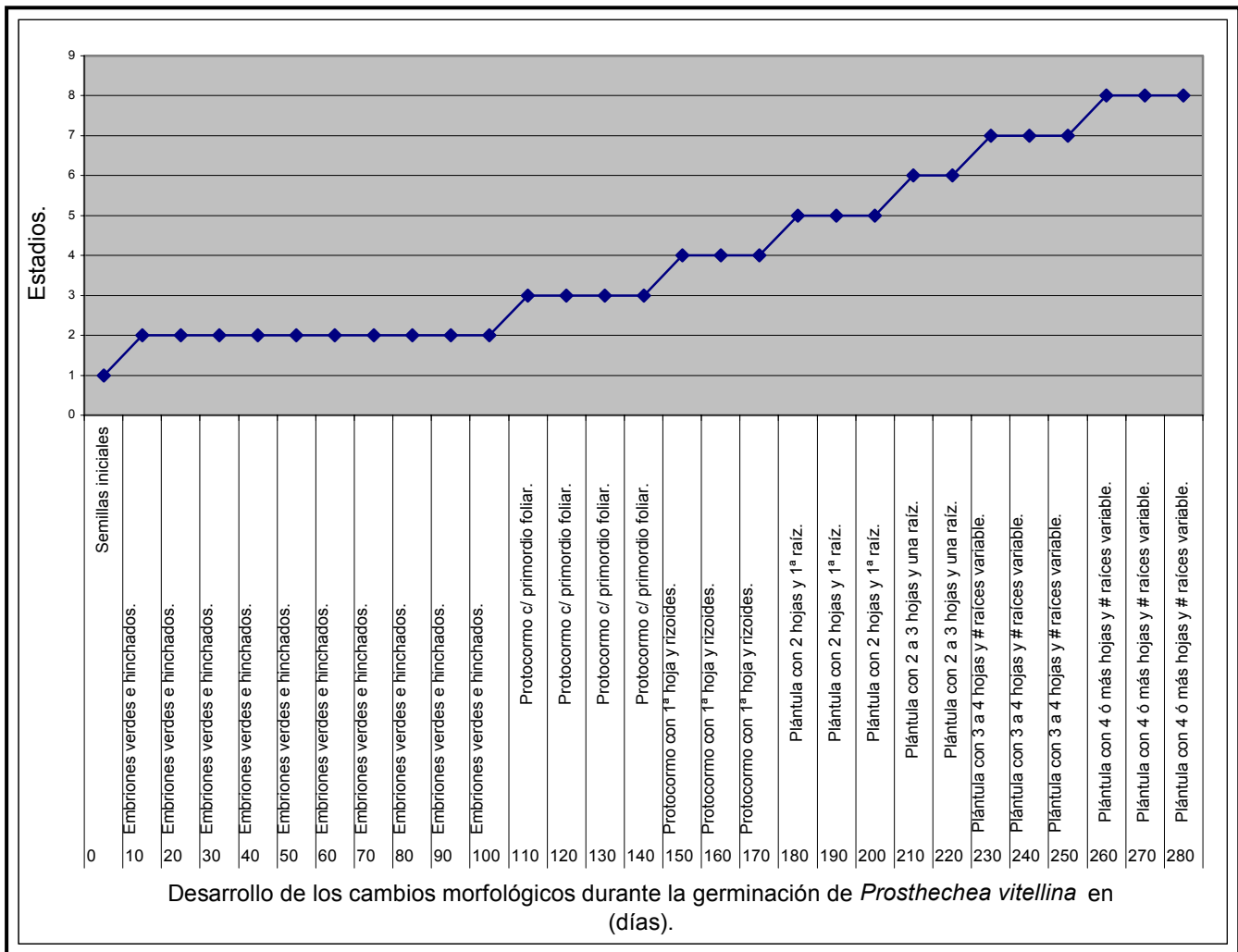


Fig.18. Gráfica de germinación *in vitro* de *Prosthechea vitellina*.

En este estudio se evidenció que la velocidad de cambio morfológico de un estadio al siguiente en *Prosthechea vitellina* fue muy variable siendo el estadio dos el de más larga duración ya que el embrión permaneció en él alrededor de 100 días (figuras 19 y Cuadro 4). El cambio de un estadio al otro en general duró en promedio 30 días y el proceso completo desde germinación de semillas hasta plantas completas comprendió un desarrollo morfológico de 260 días.

DÍAS	CARACT. FÍSICAS DE LA PLÁNTULAS	ESTADIO
0	Semillas iniciales	1
10	Embriones verdes e hinchados	2
110	Protocormo con primordio foliar	3
150	Protocormo con una hoja y rizoides	4
180	Plántulas con dos hojas y una raíz	5
210	Plántulas con 2 y 3 hojas y una raíz	6
230	Plántulas con 3 y 4 hojas y varias raíces	7
260	Plántulas con más de 4 hojas y varias raíces	8

Cuadro 4. Número de estadios y descripción morfológica de c/u durante la germinación *in vitro* de *Prosthechea vitellina*.

Con relación a esto Chávez (1980), reporta que en la especie de orquídea terrestre *Bletia urbana* el proceso de formación de una planta completa con tres raíces verdaderas fue de 120 días tiempo mucho menor en comparación con *Prosthechea vitellina* que tardó en generar la primera raíz 180 días y en formar una planta completa con las mismas características de 210 a 230 días.



Durante el desarrollo de este estudio se observó que no todas las semillas de *Prosthechea vitellina* con embrión se hincharon, manteniéndose así durante todo el tiempo experimental posiblemente debido a que la testa se mantuvo impermeable y por lo tanto el embrión no se embebió de agua.

Las semillas que sí respondieron estuvieron durante 100 días en una etapa de espera en la cual aparentemente no se presentó ninguna otra respuesta a excepción del hinchamiento del embrión (Cuadro 4).

Fue claro que todos los embriones incrementaron su volumen hasta vencer la resistencia de la testa, por lo que se observó que ésta es elástica hasta cierto límite, el cual está determinado por el tamaño del embrión. A este respecto Harrison (1973) efectuó un estudio de la germinación de 55 especies de orquídeas encontrando que el inicio de la germinación estuvo entre 10 y 211 días y que la formación de plántulas abarcó de 61 a 724 días, lo que nos muestra que el tiempo de germinación es muy variable en cada especie.

La aparición de la primera hoja verdadera de *Prosthechea vitellina* se evidenció hasta los 150 días, a diferencia de *Encyclia tampensis* que se reporta su aparición a los 90 días (Zettler, *et al.*, 1999).

Dentro de los resultados obtenidos en este estudio es importante señalar que se indujo espontáneamente la dediferenciación celular en algunos protocormos ( $\pm 3\%$ ) obteniéndose la formación de tejido caloso el cual generó embriones somáticos algunos degeneraron y murieron, pero se observó que una gran cantidad de estos embriones llegaron a formar plantas completas. Este proceso de des-diferenciación y formación de embriones somáticos ha sido reportado también en *Cypripedium formasanum* (Yung-I, 2003).

En este estudio no hubo brotación adventicia *in vitro* como sucede en *Cattleya walkeriana* donde algunas plántulas desarrollaron brotes a los setenta días de iniciado el cultivo (Obaidul, *et al.*, 2000).

### 5.1.3 Medio nutritivo MS

El éxito en el cultivo *in vitro* depende de la selección del medio nutritivo. Las células de muchas especies de plantas pueden ser cultivadas por completo en un medio definido (Gamborg, *et al.*, 1976), pero es importante conocer los requerimientos nutrimentales de cada especie ya que un medio que puede ser adecuado para una especie puede ser altamente tóxico para otra.

El uso del medio MS es un claro ejemplo en sus distintas formulaciones posteriores con muy buen resultado. En este estudio se consideró al medio de cultivo MS utilizado como un medio adecuado para obtener la germinación asimbiótica *in vitro* de *Prosthechea vitellina* (Fig. 19).

Diversos autores (Arditti, 1977; Martínez, 1991; Stenberg y Kane, 1998; Padrón, 2006) han reportado la geminación exitosa de otras especies de orquídeas tanto epífitas como terrestres en el medio MS, recomendando en algunos casos utilizar éste diluido al 50 y 25% de su concentración. Stenberg y Kane (1998) señalan que el medio MS induce una elevada germinación por las altas concentraciones de amonio de éste medio (20.61 mM).



Fig. 19. Protocormos de *Prosthechea vitellina* en medio MS.

Estudios realizados de la composición del agua de escorrentías de las ramas y troncos de los árboles indican que el medio MS está alrededor de 136 veces más concentrado que como recibe los nutrientes una planta en campo. El medio MS fue desarrollado para producir un crecimiento máximo de callo de tabaco, pero para ciertos tipos de tejidos es posible que represente una concentración de sales muy elevadas Hartmann y Kester (1983).

Estas observaciones se confirman con los resultados obtenidos con el medio MS a la mitad de la concentración original de sales, habiéndose obtenido una mejor germinación de la orquídea epífita *Lycaste skinneri* var *skinneri* (Martínez, 1991) y en la orquídea terrestre *Govenia capitata* (Padrón, 2006) entre otras.

Ramírez (1990), reporta el cultivo *in vitro* de *Prosthechea vitellina* en los medios nutritivos VW y KC donde se señala que en este último sólo obtuvo menos del 1% de respuesta y que en el medio VW no hubo respuesta alguna cuando carecían de sacarosa. Con la adición de 2-2.5 % de sacarosa se obtuvo el 33 % de germinación, volviéndose tóxica en concentraciones del 3%. A este respecto nuestros resultados difieren ya que

se añadió al medio MS 30 gr/l de sacarosa sin manifestarse ningún efecto de toxicidad aparente en este estudio y obteniendo el 21.5% de germinación.

El medio nutritivo que se empleó en este estudio no fue adicionado con ningún tipo de fitoregulador ni complejo natural que tuviera dentro de su composición algún tipo de fitohormona, por lo cual las respuestas morfológicas obtenidas (generación de callo y embriogénesis somática) fueron de un carácter no inducido.

Existen reportes de estos tipos de respuesta morfogénica en orquídeas mediante la adición de complejos naturales como extracto de taro en especies de *Cattleya* (Obaidul *et al.*, 2000), de papa en *Cypripedium* y *Dendrobium* (Lee y Lee, 2003; Shiau, *et al.*, 2005 b), germinado de soya etiolado en *Cattleya* (Obaidul, 2000), semillas inmaduras de haba en *Cattleya walkeriana* (Obaidul, 200), homogenizado de plátano en *Dendrobium tosaense* (Lo *et al.*, 2004), endospermo líquido de coco en especies de *Dendrobium* (Roy, 2003; Lo, *et al.*, 2004), levadura deshidratada en *Phalaenopsis* (Tokuhara, 2003), entre otros.

Aunque el medio MS completo ha sido utilizado exitosamente en el cultivo *in vitro* de orquídeas (Yung-I, 2003; Shiau, *et al.*, 2005), por lo general no es muy usado en la germinación de semillas, sin embargo en éste estudio se demostró que las semillas de *Prosthechea vitellina* respondieron satisfactoriamente al utilizar el medio MS al 100% logrando su germinación asimbiótica *in vitro*.

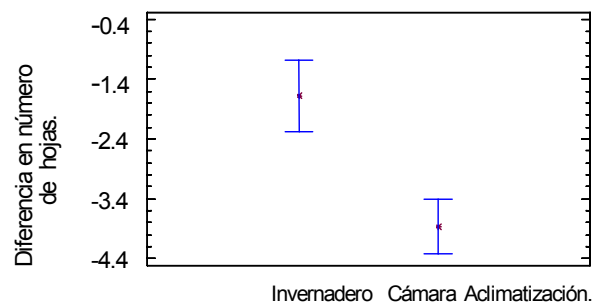
## 5.2 Aclimatización de plantas de *Prosthechea vitellina* a condiciones *ex vitro*.

### 5.2.1 Efecto de la vía de aclimatización en el desarrollo de las plantas de *Prosthechea vitellina*

#### ➤ Número de hojas

Se encontraron diferencias significativas entre la aclimatización en invernadero y en la cámara de incubación. Las dos vías indujeron pérdida de hojas, sin embargo resultó más favorable la aclimatización en invernadero ya que la pérdida fue menor (gráfica 1).

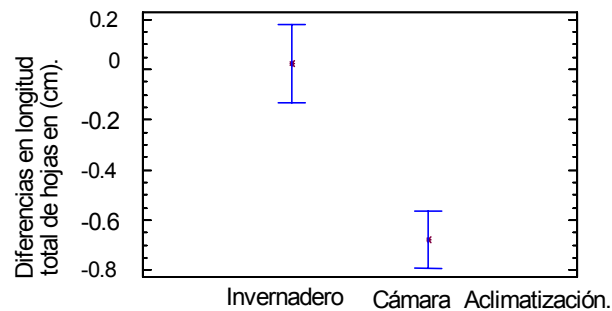
**GRAFICA 1.** Diferencias en el número de hojas en respuesta a la aclimatización vía invernadero y vía cámara de incubación.



➤ Longitud total de las hojas.

La vía de aclimatización si afectó la sumatoria de longitudes totales de las hojas aunque este efecto pudo estar relacionado directamente a la pérdida de hojas preexistentes o a la formación de nuevas. Cabe mencionar que no todas las plantas se comportaron de la misma forma, en algunos casos sólo se perdieron las hojas de longitud superior lo que influyó mayormente el resultado, pero al mismo tiempo, en otros se estimuló el crecimiento de las hojas preexistentes volviéndose más vigorosas. Algunas plantas se presentaron la formación de hojas nuevas de apariencia más resistente pero de menor longitud (gráfica 2).

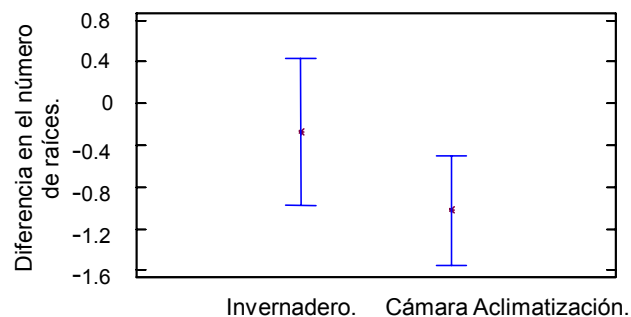
**GRAFICA 2.** Diferencias en longitud de las hojas 6 meses después de la aclimatización en invernadero y cámara de incubación.



➤ Número de raíces.

En el número de raíces al final de la aclimatización se evidenció que la vía de aclimatización no es relevante ya que no hubo diferencias significativas entre las vías. La formación de raíces se logró tanto en la cámara de incubación como en el invernadero y aunque en las dos vías hubo pérdida de raíces existió también la generación de otras nuevas. Como se puede ver (gráfica 3) las plantas que siguieron la aclimatización en la cámara de incubación no recuperaron el número de raíces iniciales, sin embargo, la vía invernadero sí incrementó el número de raíces al final de la prueba.

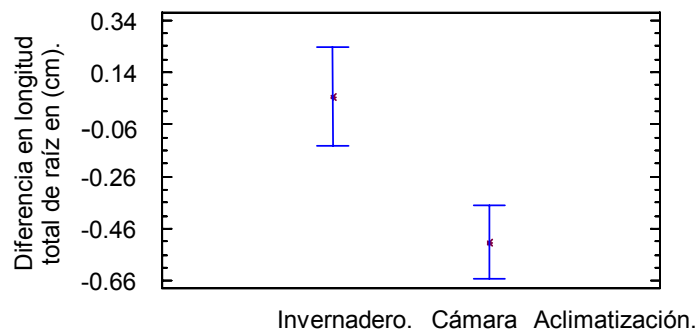
**GRAFICA 3.** Diferencias en el número de raíces por las vías de aclimatización invernadero y cámara de incubación.



➤ Efecto en la longitud de las raíces.

La aclimatización en invernadero indujo el crecimiento y generación de nuevas raíces lo que se manifestó en la diferencia significativa entre las longitudes totales de las raíces entre vías de aclimatización. La menor longitud final (valores negativos), ver gráfica 4, se debió a que al inicio de la aclimatización algunas plantas perdieron las raíces de mayor longitud e iniciaron la formación de otras pequeñas. Se observó que existieron plantas que no tuvieron ninguna pérdida de raíces pero éstas modificaron su color, grosor y textura aparente.

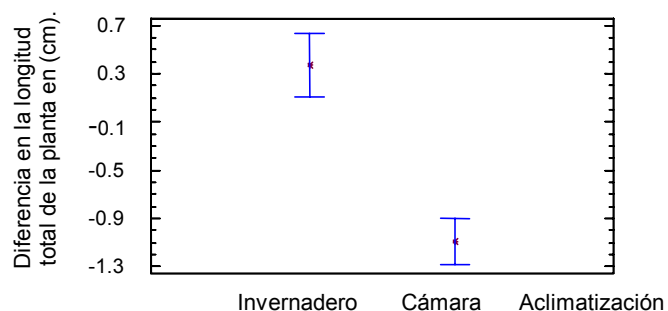
**GRAFICA 4.** Diferencias en la longitud total de las raíces al final de la aclimatización en invernadero y cámara de incubación.



➤ Longitud total de las plantas.

Fue claro al evaluar las longitudes totales finales de las plantas que la vía por la cual iniciaron su aclimatización fue definitiva para su desarrollo, ya que las plantas más grandes se obtuvieron mediante la aclimatización en invernadero como se puede ver en la gráfica 5, en la cual también se aprecian los valores negativos en el tamaño de las plantas aclimatizadas en la cámara de incubación.

**GRAFICA 5.** Diferencia en la longitud total final de las plantas en aclimatización en invernadero y en la cámara de incubación.



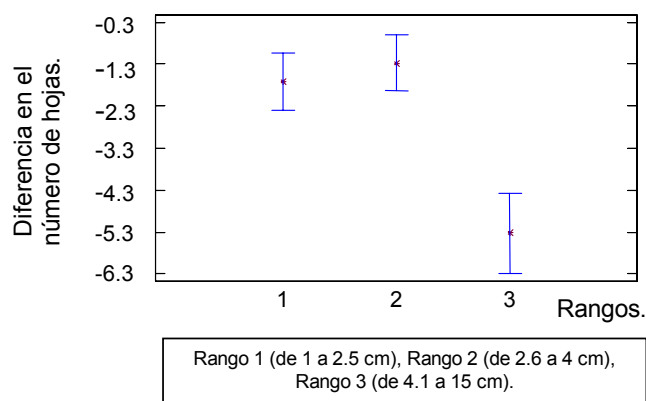
➤ Efecto en el número de hojas.

Con respecto a la influencia del rango se observó que éste sí influye en la permanencia de hojas independientemente de la vía de aclimatización seguida, ya que los tres rangos presentaron la pérdida de hojas.

El rango de mayor tamaño (de 4.1-14 cm) perdió hojas principalmente las más grandes, y las más pequeñas se tornaron más gruesas y consistentes. En algunas plantas se inició la formación de hojas nuevas de apariencia más vigorosa y resistente que las producidas *in vitro*, este rango fue significativamente diferente a los otros dos. Es importante señalar que hubo pérdida de plantas en este rango.

La diferencia de pérdida de hojas entre el rango 1 y 2 no fue estadísticamente significativa entre ellas, en éstos rangos las plantas retrasaron la formación de nuevas hojas y el crecimiento de las preexistentes, las cuales, se tornaron más gruesas y ligeramente endurecidas. pero sí fue significativa en comparación con el rango tres. La diferencia máxima en número de hojas entre rangos fue de dos a tres por planta (gráfica 6).

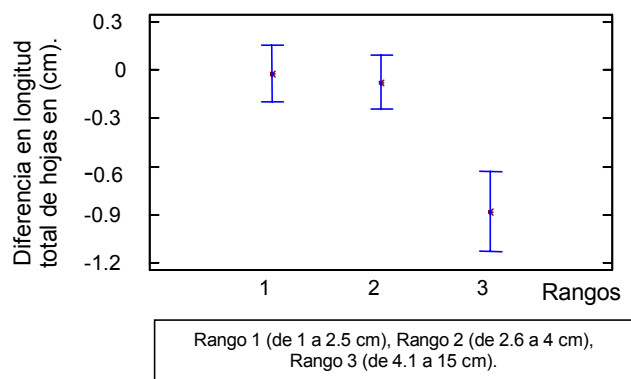
**GRAFICA 6.** Diferencia en el número de hojas por tamaño (rango) de la planta.



➤ Longitud de las hojas.

Además de la influencia de la vía de aclimatización en la longitud total de hojas, el rango también influyó en ésta respuesta encontrando que entre más chica fue la plántula (rangos 1 y 2) más conservó sus hojas ó generó nuevas, a diferencia del rango de mayor tamaño (rango 3) de plántula el cual tuvo una disminución sustancial de la longitud al final de la aclimatización, esto debido a que las hojas de longitud mayor al ser expuestas a condiciones de baja humedad se deshidrataron y murieron rápidamente. Se observó pérdida de plantas en el rango tres lo que afectó los resultados finales (gráfica 7).

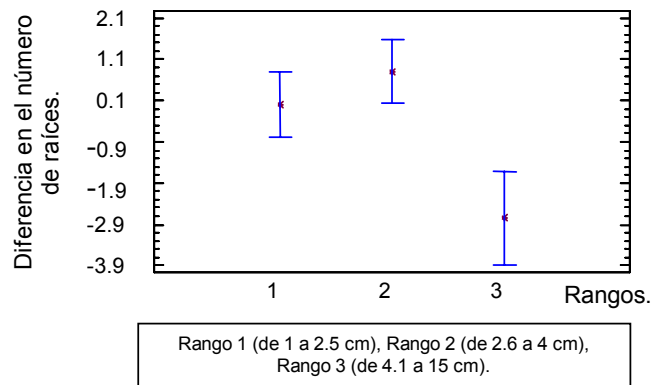
**GRAFICA 7.** Diferencias en la longitud de las hojas y el tamaño de las plantas al final de la aclimatización.



➤ Efecto en el número de raíces

Se demostró que el rango sí influye en el número final de raíces. Las plantas del rango tres presentaron una mayor pérdida de raíces durante la aclimatización así como una mayor mortalidad (gráfica 8). La diferencia en el número de raíces entre el rango 1 y 2 no es estadísticamente significativa, por lo cual ambos tamaños de planta se comportan de igual manera, sus diferencias en número de raíces fue de una a dos.

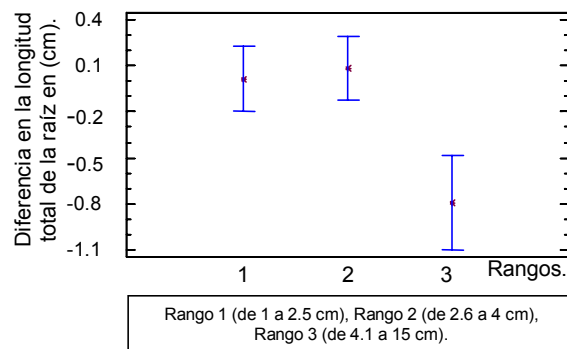
**GRAFICA 8.** Diferencias entre el número de raíces y el rango de las plantas al final de la aclimatización.



➤ Longitud de las raíces.

Fue claro que el rango sí influyó en las longitudes finales de las raíces ya que entre más grande era la planta (rango 3) menor longitud tuvieron. Las plantas más pequeñas presentaron raíces de menor longitud las que no necesariamente perdieron al inicio de la aclimatización siendo al contrario en las plantas mas grandes las cuales sí perdieron las raíces de mayor longitud, influyendo así en los valores finales que fueron negativos (gráfica 9).

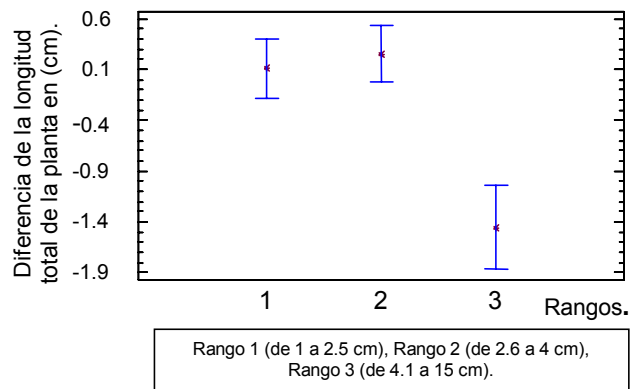
**GRAFICA 9.** Diferencias en la longitud total de las raíces y el tamaño (rango) de las plantas al final de la aclimatización.



➤ Efecto en la longitud total de las plantas.

Al final de la prueba se demostró que el rango de plantas mayores (rango 3) tuvo una mayor pérdida de estructuras y el menor crecimiento (gráfica 10). No se observaron diferencias significativas entre los rangos 1 y 2, pero tanto en los rangos 1 y 3 como en los rangos 2 y 3 si existieron diferencias significativas ya que este último incluso presentó valores negativos. Las plantas del rango 3 presentaron mayor pérdida de estructuras preexistente y la formación de hojas nuevas y raíces. Cabe señalar que al finalizar esta prueba (180 días) las plantas más grandes presentaron un pseudobulbo de almacenamiento lo que evidenció un nuevo nivel de desarrollo el cual no se observó aún en los rangos 1 y 2.

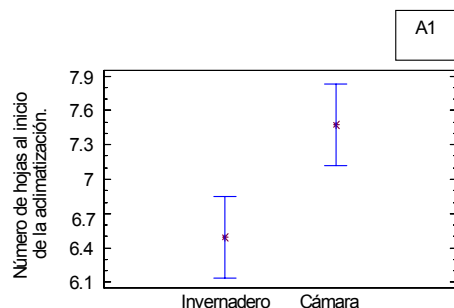
**GRAFICA 10.** Diferencias en la longitud total de las plantas y el tamaño de las plantas en la aclimatización.

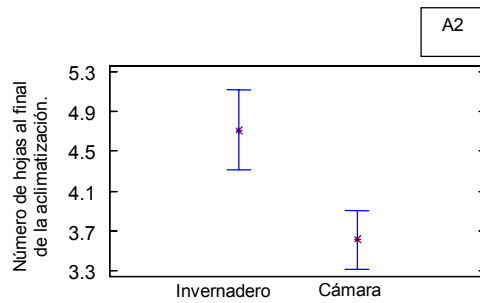


### 5.2.2 Comparación del desarrollo de estructuras y de las plantas de *Prosthechea vitellina* al inicio y al final de la prueba en las dos vías de aclimatización (invernadero y cámara de incubación).

El número de hojas disminuyó en la aclimatización por las dos vías, como se puede ver (gráficas A1 y A2), pero indudablemente la vía más adecuada fue la de invernadero, ya que la disminución en el número de hojas en la aclimatización por la vía de la cámara es significativamente mayor.

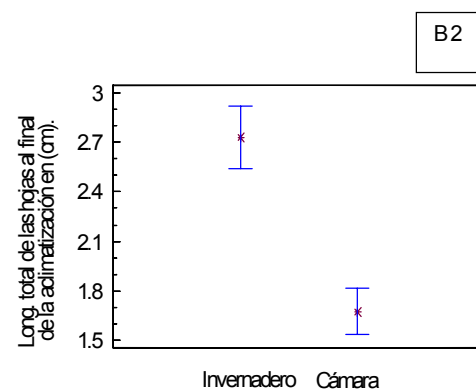
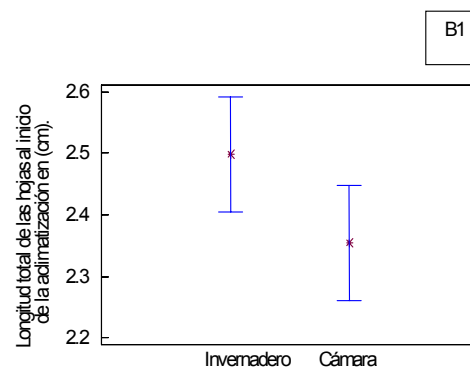
**Gráficas A1. y A2.** Efecto de la vía de aclimatización en la formación de hojas.





Al inicio de la prueba no existían diferencias significativas en ambas vías de aclimatización sin embargo posteriormente en la aclimatización en invernadero si se observó un pequeño incremento en la longitud de las hojas, por el contrario en la cámara se registró una importante disminución en el valor de longitud de las hojas lo que explica las diferencias significativas que se observan al final de la prueba (gráficas B1 y B2).

**Gráficas B1. y B2.** Efecto de la vía de aclimatización en la longitud de las hojas.

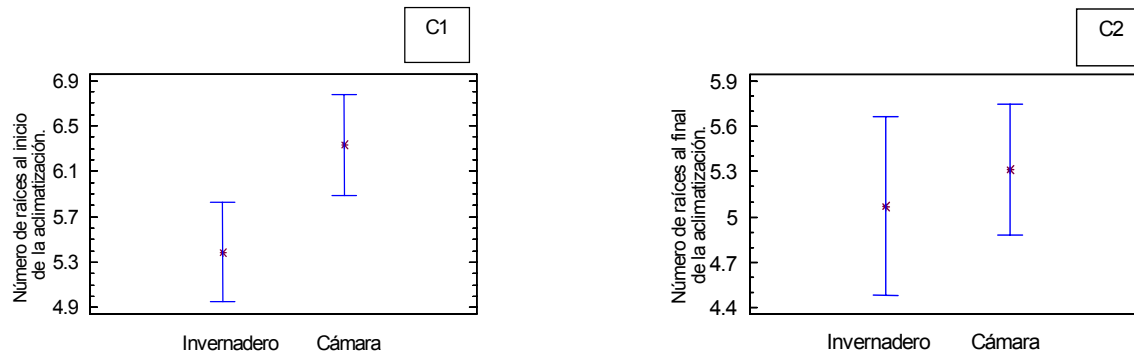


Al final de la prueba la cantidad de raíces es similar independientemente de la vía que haya seguido la *Prosthechea vitellina*



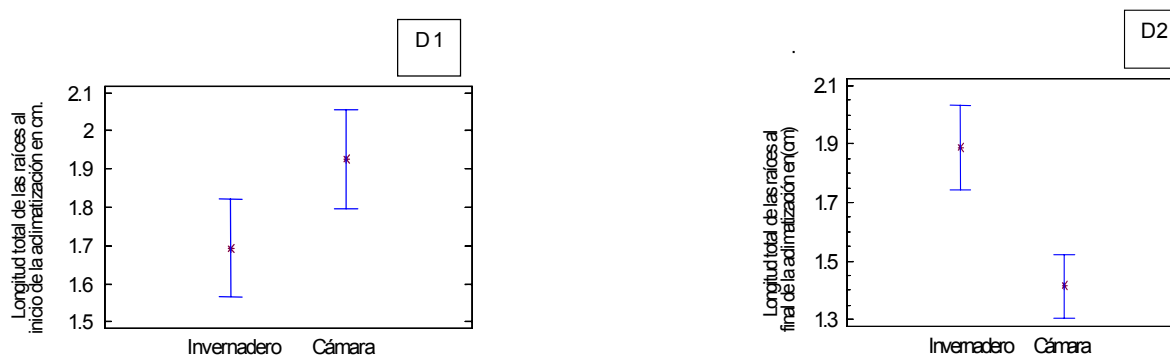
planta, por lo cual la pequeña diferencia inicial a favor de la vía cámara de incubación se perdió por el efecto de la vía (gráficas C1 y C2). Es importante hacer notar que en ambas vías se observa una disminución en el número de raíces.

**Gráficas C1. y C2.** Efecto de la vía de aclimatización en la formación de raíces.



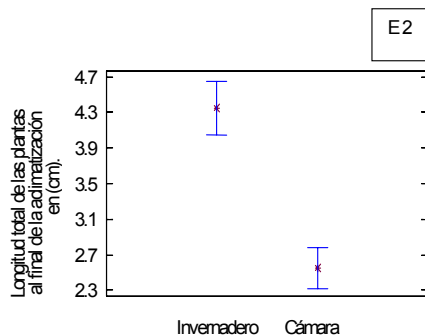
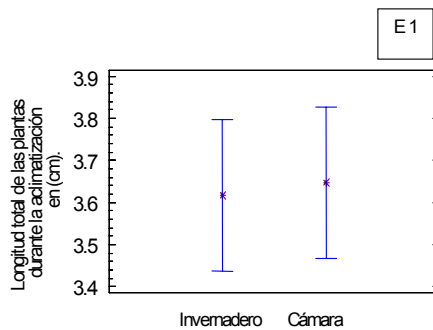
La vía sí determinó diferencias en el desarrollo de la raíz siendo mejor la vía invernadero ya que en ésta se incrementó la longitud total del sistema radical a diferencia de la vía cámara de incubación que indujo incluso una disminución significativa en la presencia de sistema radical (gráficas D1 y D2).

**Gráficas D1. y D2.** Efecto de la vía de aclimatización en el incremento en la longitud de las raíces.



De acuerdo a los resultados la vía tiene una muy grande influencia en el crecimiento del tallo ya que al inicio de la prueba no había diferencias significativas y al final de la prueba la longitud del tallo de las plantas que siguieron la vía invernadero fue muy superior a las que siguieron la vía cámara de incubación (gráficas E1 y E2).

**Gráficas E1. y E2.** Efecto de la vía de aclimatización en el incremento de la longitud total de las plantas.



- Comparación del desarrollo de estructuras y de las plantas de *Prosthechea vitellina* al inicio y al final de la prueba en las dos vías de aclimatización (invernadero y cámara de incubación).

En esta comparación del desarrollo de las plantas y de sus estructuras, se evidenció que el número de hojas fue más favorecido si la aclimatización se dio por la vía invernadero, ya que la pérdida de estructuras fue menor que por la vía de la cámara. Es importante señalar que en ambos casos hubo pérdida de estructuras pero en la cámara se perdió más de la mitad de hojas iniciales, cantidad que fue mucho mayor que en el invernadero.

Con respecto a la longitud de las hojas se encontró que la aclimatización en el invernadero incrementa los valores iniciales de longitud. En contraste, la cámara afecta negativamente a las plantas ya que éstas presentaron hojas de menor longitud que al inicio, lo cual se puede explicar mediante la pérdida de las hojas más largas y la sustitución de éstas por unas más jóvenes y cortas.

En relación al número de raíces ambos métodos indujeron la disminución de la cantidad de raíces por planta, sin embargo, en la cámara fue menor esta pérdida.

La longitud de las raíces fue favorecida en el invernadero ya que hay menos pérdida que en la cámara.

La talla de la planta es beneficiada cuando la aclimatización es en el invernadero ya que en la cámara inclusive se disminuyen los valores iniciales de longitud total, esto se puede explicar mediante la pérdida de las

estructuras más largas (hojas y raíces) de las plantas, ya que las mediciones iniciales y finales se efectuaron desde la punta de la raíz más larga hasta la punta de la hoja más larga de cada planta.

En términos generales fue mejor la aclimatización en el invernadero, ya que se vieron más favorecidos los parámetros; número de hojas, longitud de hojas, longitud de raíces y longitud total de la planta, en comparación con la cámara que sólo favoreció el incremento en el número de raíces.

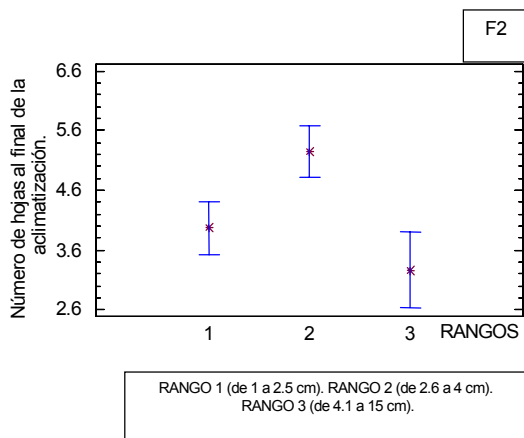
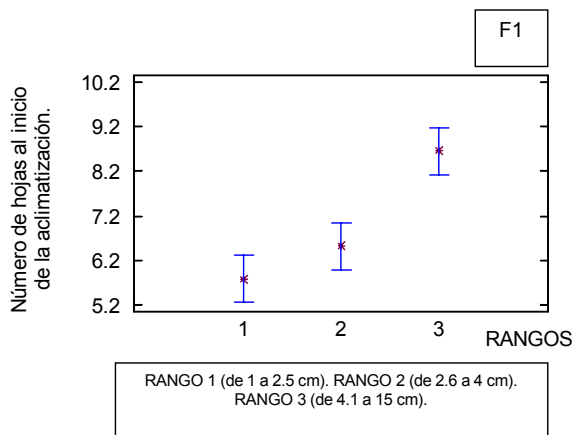
El endurecimiento de las plantas bajo condiciones de invernadero es altamente benéfico para una aclimatización exitosa. *Prosthechea vitellina* es una planta que se distribuye naturalmente en áreas tibias y húmedas y requieren de un ambiente húmedo y tibio con luz abundante para un crecimiento y desarrollo óptimo.

### 5.2.3 Comparación del desarrollo de las plantas de *Prosthechea vitellina* y sus estructuras en los tres rangos de tamaño.

Al inicio de las pruebas si hubo diferencias entre rangos en relación al número de hojas, siendo significativamente diferentes el rango 3 con respecto al 1 y 2. Durante la prueba se encontró que el rango 2 fue

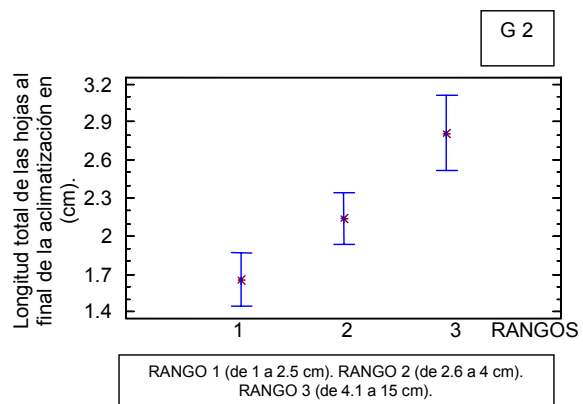
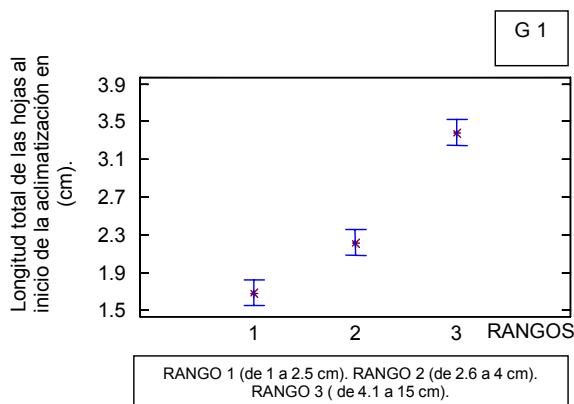
el mejor, si bien no aumentó significativamente el número de hojas tampoco disminuyó en cantidad como sucedió en los rangos 1 y 3 (gráficas F1 y F2).

**Gráficas F1. y F2.** Efecto del rango de tamaño de las plantas en la formación de hojas.



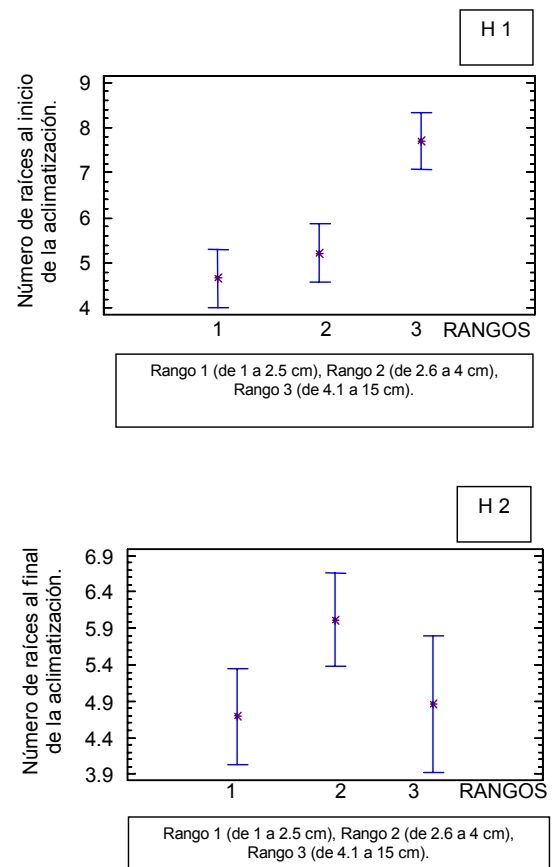
La longitud de hoja final no dependió del rango ya que tanto en el inicio como en el final de la prueba se mantuvieron diferentes significativamente entre sí los tres rangos, sin embargo el rango 1 y 2 no disminuyeron sus valores iniciales negativamente como sucedió en el rango 3 (gráficas G1 y G2).

**Gráficas G1. y G2.** Efecto del rango de tamaño de las plantas en el incremento de longitud de las hojas.



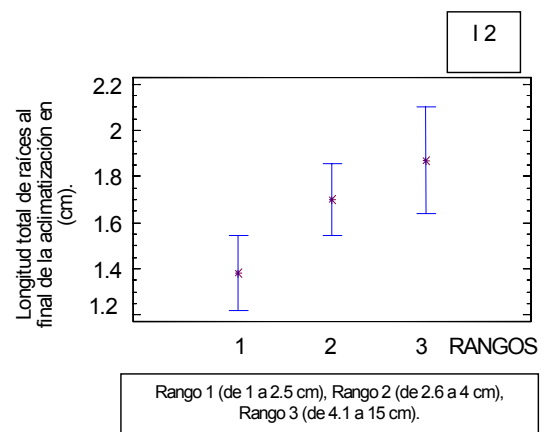
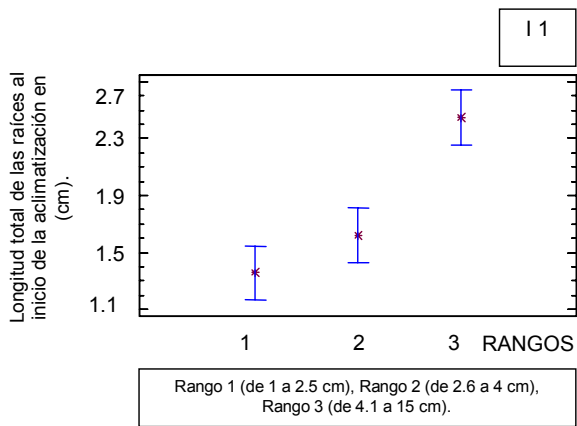
El rango 2 resultó ser el de mayor productividad en relación a la cantidad de raíces ya que sus valores se ven incrementados al final de la aclimatización, el rango 1 se mantuvo prácticamente sin cambios, siendo el rango 3 el más susceptible a la aclimatización (gráficas H1 y H2). Al final los valores no presentan diferencias significativas pero el rango 3 disminuyó drásticamente sus valores finales lo que significa que hubo gran pérdida de raíces en estas plantas.

**Gráficas H1. y H2.** Efecto del rango de tamaño de las plantas en la formación de raíces.



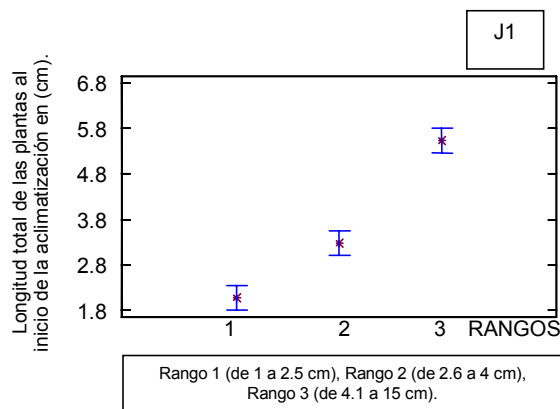
La influencia del rango en el crecimiento de la raíz al final de la prueba no fue significativa, ya que si bien al principio si había diferencia en el rango 3, esta se perdió debido al incremento en longitud de los rangos 1 y 2 y a que el rango 3 tuvo una disminución importante en los valores de la longitud de sus estructuras radicales (gráficas I1 Y I2).

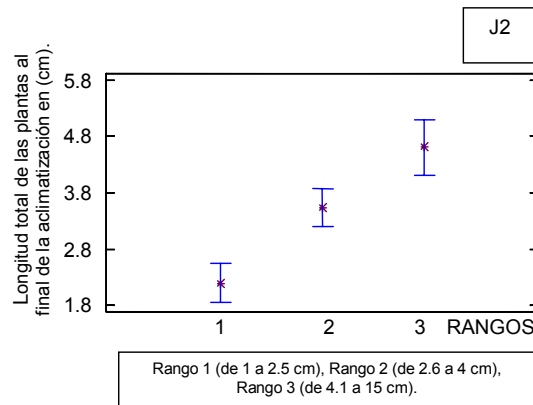
**Gráficas I1. y I2.** Efecto del rango de tamaño de las plantas en el incremento de la longitud de las raíces.



Se determinó que los rangos 1 y 2 incrementaron sus valores de longitud total de las plantas, en cambio el rango 3 sufrió una disminución importante en sus valores (gráficas J1 y J2), sin embargo se mantuvieron las diferencias significativas iniciales.

**Gráficas J1. y J2.** Efecto del rango de tamaño de las plantas en el incremento de la longitud total de las plantas.





- Comparación del desarrollo de las plantas de *Prosthechea vitellina* y sus estructuras en los tres rangos de tamaño.

Con respecto al número de hojas se manifestó pérdida en los tres rangos siendo menor ésta en el rango 2, por lo que se considera que fue el más favorecido.

Durante esta prueba los rangos 1 y 2 no incrementaron la longitud de las hojas, o sea no hubo crecimiento, a diferencia del rango 3 el cual manifestó valores menores que al inicio, lo cual se puede explicar por la pérdida (abscisión o muerte) de sus estructuras foliares más largas.

El rango 2 indujo la formación de raíces nuevas y fue mejor que los rangos 1 y 3. El rango 3 fue el único que tuvo pérdida significativa de estructuras radicales mientras que el rango 1 no tuvo modificación del número promedio de raíces.

El rango 2 presentó la mayor longitud de raíces y fue mejor que los rangos 1 y 3. El rango 3 fue el único que tuvo disminución significativa de la longitud radical mientras que el rango 1 no tuvo modificación.

En consecuencia a los resultados anteriores la longitud total de la planta no se vio incrementada ni disminuida significativamente en los rangos de tamaño 1 y 2, siendo el rango 3 el único que dio valores de disminución esto debido a la muerte de hojas y raíces más largas y a la muerte de casi el 30% de las plantas.

En términos generales se puede apreciar que el rango de tamaño 2 es el que tuvo una mejor respuesta de crecimiento y desarrollo, ya que fue mejor en el incremento en número de hojas, incremento en el número y la longitud final de las raíces. Por otra parte el rango 3 fue el que presentó la respuesta más negativa ya que en todos los parámetros tuvo disminuciones significativas con relación a los valores iniciales.



### 5.3 Aclimatización de las plantas de *Prosthechea vitellina* a condiciones de invernadero.

#### 5.3.1 Sustratos

Fig.20. Preparación de mezclas de sustratos para siembra de *Prosthechea vitellina* a condiciones de invernadero.

De la mezcla 1 (esfagnum, agrolita y carbón activado) cuyos componentes fueron de fácil manejo, buen drenaje, aireación, retención de humedad adecuada, propició el desarrollo de las raíces que se sujetaron fácilmente a las partículas de éste y las plantas se establecieron en corto tiempo, en la (Fig. 21) se presenta una planta sana autótrofa con generación de hojas nuevas y pseudobulbo que fue trasplantada en la mezcla 1. La mezcla fue inerte antiséptica y con una textura suave y ligera apropiada para las raíces y la planta.



Fig. 21. *Prosthechea vitellina* aclimatizada en invernadero en mezcla 1 (esfagnum + agrolita + carbón activado).

Por otra parte acumuló fácilmente sales tanto del agua como del fertilizante por lo que fue necesario extremar el control de riegos utilizando agua destilada y utilizando solución nutritiva de aplicación foliar.

Principalmente la agrolita y el carbón activado retuvieron en su superficie sales, quedando éstas en contacto con las raíces lo que las dañó. Se hicieron lavados para eliminar las sales y solucionar el problema.

La mezcla resultó muy ligera y ofreció poco soporte a las plantas, al sumergir el recipiente en agua flotaron sus componentes, desacomodando las plantas sobre todo al inicio de la aclimatización, por lo que fue necesario humedecerla para hacerla más consistente,



Fig. 22. Plantas de *Prosthechea vitellina* autótrofas en mezclas de sustratos.



Fig.23. Planta aclimatizadas en invernadero con estructuras foliares y radicales vigorosas

el alto drenaje y aireación propició la pérdida de humedad muy rápidamente, en ocasiones se desecó por lo que fue necesario regar más frecuentemente (cuatro a cinco veces por semana) en consecuencia no favoreció la aparición microorganismos y hongos.

En la (Fig. 22) están las plantas ya autótrofas trasplantadas en las tres mezclas todas se observan bien adaptadas y vigorosas de izquierda a derecha los dos primeros recipientes tienen la mezcla de esfagnum, agrolita y corteza de encino; el tercer y quinto recipiente tienen la mezcla de esfagnum, agrolita y carbón activado, en el cuarto recipiente la mezcla está conformada de esfagnum, corteza de encino y carbón activado.

Con la mezcla 2 (esfagnum, agrolita y corteza de encino) el esfagnum y la agrolita como ya mencionamos fueron fáciles de manejar sin embargo la corteza de encino requirió romperse y por su dureza no fue fácil obtener partículas de un mismo tamaño, requirió de más tiempo de esterilización para asegurar estuviera libre de microorganismos. Las ventajas de la mezcla fueron que tuvo una buena consistencia, los trozos de encino



proporcionaron buen soporte a las plantas. La mezcla tuvo buen drenaje y aireación presentó buena retención de humedad por lo que difícilmente llegó a estar totalmente seca, el encino favoreció el desarrollo de la planta y de raíces bien desarrolladas que se sujetaban a las partículas de la mezcla en corto tiempo, no presentó problema al sumergirla en agua y acumuló pocas sales del agua de riego y la fertilización. Dentro de las desventajas de esta mezcla, fue que se tuvo que tener especial cuidado con el riego y la ventilación del área, regulando según la temperatura y la humedad del medio ambiente la cantidad de agua mínima necesaria porque cuando no hubo mucha evaporación la mezcla guardó una alta humedad favoreciendo la aparición de hongos y otros microorganismos que afectaron a las plantas.

La mezcla 3 (esfagnum, corteza de encino y carbón activado), se comportó de manera similar a la mezcla 2 ya que tuvo un buen drenaje y aireación aunque también requirió de mayor ventilación y mayor temperatura ambiental, se controló el riego de acuerdo a las condiciones ambientales, tuvo buena consistencia y brindó soporte a las plantas, fue el más pesado de las tres mezclas, favoreció el desarrollo de las raíces aunque presentó más resistencia para que éstas penetraran, no retuvo de forma apreciable las sales del agua y fertilizante; las plantas se desarrollaron sanas y no presentó problemas al regarla por inmersión.

Un inconveniente fue que mantuvo una alta humedad lo que favoreció la aparición de hongos y microorganismos a pesar de sus materiales antisépticos, se tornó verdosa por la presencia de musgos pero no se apreció que esto afectara a las plantas. La utilización de soluciones fungicidas muy frecuentes (cada quince días) provocó una acumulación de partículas de fungicida en la mezcla y en las plantas tornándose amarillas tanto las estructuras foliares como las estructuras radicales, lo que se solucionó lavando las plantas para eliminar el fungicida y cambiando las plantas a mezcla nueva aplicando solución fungicida una vez por mes.

Como puede apreciarse las tres mezclas presentaron cualidades e inconvenientes y su manejo en invernadero para la aclimatización de orquídeas no es el mismo, éste varía dependiendo de la humedad, la ventilación, la iluminación y la temperatura del invernadero y de la cámara de aclimatización. En general en las tres se aclimatizaron las plantas pero en las mezclas 2 y 3 tuvieron una apariencia más vigorosa en las (Figs. 23 y 24) se aprecia el desarrollo del sistema radical y foliar, el color verde intenso, mientras que en la mezcla 1 siempre se observaron plantas con hojas más amarillentas y algunas de las raíces oscuras.



Fig. 24. *Prosthechea vitellina* al final de la aclimatización.

El proceso de aclimatización de las plantas fue paulatino y cuidadoso en las dos vías de aclimatización, cada semana se abrieron un poco más las botellas de la parte superior hasta que al mes se corto prácticamente la mitad de la botella quedando las plantas expuestas totalmente a las condiciones del invernadero. Cuando las plantas desarrollaron la capacidad de controlar su transpiración haciendo sus estomas más activos, además de que sus estructuras tanto hojas como raíces se tornaron resistentes, más gruesas y consistentes, se percibió una diferencia importante en la textura de sus estructuras comparada con la consistencia que tenían al inicio de la aclimatización, además de la generación de nuevas estructuras, por lo que a los cinco meses se hicieron cortes transversales a los recipientes y quedaron

como macetas sin tener que trasplantar o cambiar de recipiente las plantas; dicho corte se hizo sin causar daño las plantas ya que el material lo permitió, de ésta manera se logró la aclimatización en un solo tipo de recipiente que finalmente se desechó o se reutilizó. En el periodo de aclimatización en el invernadero las plantas tuvieron el ataque de *Evonymus sp* que es un parásito muy dañino para las orquídeas. Se aloja en los pliegues de la base de las hojas o se adhiere en el envés de las mismas y en poco tiempo se tornaron amarillentas y se perdió la hoja.

Se controló por medio de la limpieza exhaustiva de las estructuras foliares de las plantas con hisopos humedecidos con etanol al 70% inspeccionando diariamente las plantas hasta que no se detectó nuevamente un brote.

También se presentó una plaga de araña roja, pero aunque su presencia fue mínima se controló mediante la limpieza del área donde se encontraban las plantas y la aplicación de pesticida a las paredes de las macetas, charolas y bancal evitando el contacto de las plantas con el insecticida.

En la (Cuadro 5) se presentan las características de las mezclas que se pusieron a prueba además de las ventajas y desventajas que presentaron para la aclimatización de *Prosthechea vitellina*, las mezclas reunieron las características de sustratos (Fig. 25) que individualmente aportan cualidades útiles para el trasplante de orquídeas y que se aprovecharon en éste trabajo.

CARACTERISTICAS.	MEZCLA 1 Esfagnum+agrolita+carbón.	MEZCLA 2 Esfagnum+agrolita+encino.	MEZCLA 3 Esfagnum+encino+.carbón.
Porosidad	***	***	**
Drenaje	***	**	**
Aireación	***	**	**
Soporte.	*	***	***
Inerte.	***	**	*
Acumulación de sales	***	**	*
Antiséptico.	***	**	**
Económico.	*	**	**
Fácil manejo.	***	***	***
Fácil obtención.	**	**	**

\*\*\* = Alta.  
\*\* = Regular.  
\* = Baja.

Cuadro 5. Características de las mezclas utilizadas en la aclimatización de *Prosthechea vitellina*.



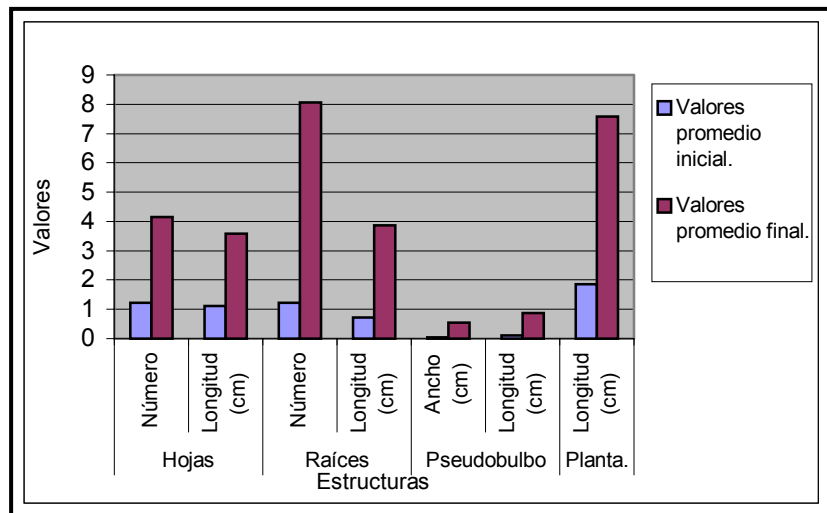
Fig. 25. Sustratos utilizados para las tres mezclas en la aclimatización de *Prosthechea vitellina*  
a) encino b) carbón c) agrolita y d) esfagnum.

### 5.3.1.1 Resultados cuantitativos de las mezclas experimentales de sustrato en el desarrollo de plantas de *Prosthechea vitellina*.

Promedios	Hojas		Raíces		Pseudobulbos		Planta
	Número	Longitud (cm)	Número	Longitud (cm)	Ancho (cm)	Longitud (cm)	Longitud (cm)
Inicial	1.22	1.12	1.22	0.71	0.05	0.12	1.85
Final	4.15	3.58	8.07	3.86	0.55	0.88	7.57

Cuadro 6. Valores de las plantas aclimatizadas en la mezcla 1 (esfagnum + agrolita + carbón).

Para establecer la mezcla más adecuada por favorecer el desarrollo de las plantas de *Prosthechea vitellina* durante la aclimatización se compararon los valores promedio de generación y desarrollo de las estructuras al inicio y al final de la aclimatización. En la mezcla 1 (esfagnum + agrolita + carbón) se observó un incremento notable en la generación de estructuras, lo que indica que la composición de la mezcla favoreció el crecimiento de las plantas además de la aparición de pseudobulbos en las que aún no lo presentaban (Cuadro 6 y gráfica correspondiente).

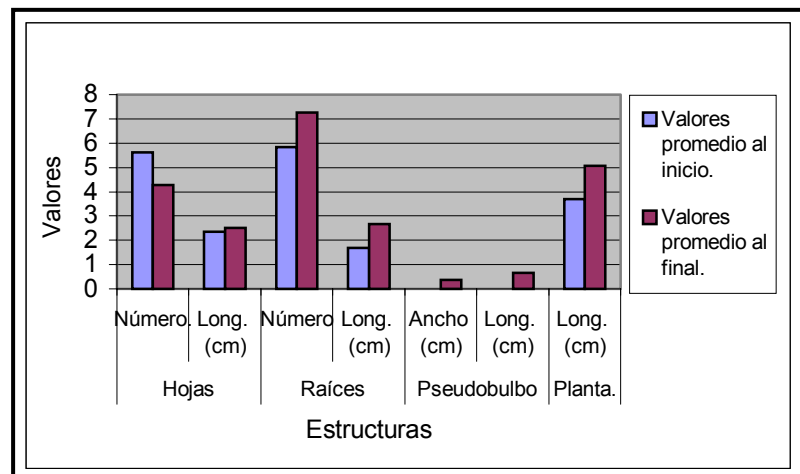


Gráfica de cuadro 6. Crecimiento y desarrollo de estructuras en la aclimatización de *Prosthechea vitellina* en mezcla 1 (esfagnum+agrolita+carbón)

Promedios	Hojas		Raíces		Pseudobulbo		Planta
	Número	Long.(cm)	Número	Long.(cm)	Ancho. Cm	Long. (cm)	Long. en (cm)
Promedio I.	5.63	2.34	5.83	1.69	0	0	3.7
Promedio F.	4.27	2.51	7.27	2.67	0.37	0.67	5.06

Cuadro 7. Plantas aclimatizadas en invernadero en sustrato 2 (esfagnum + agrolita + encino).

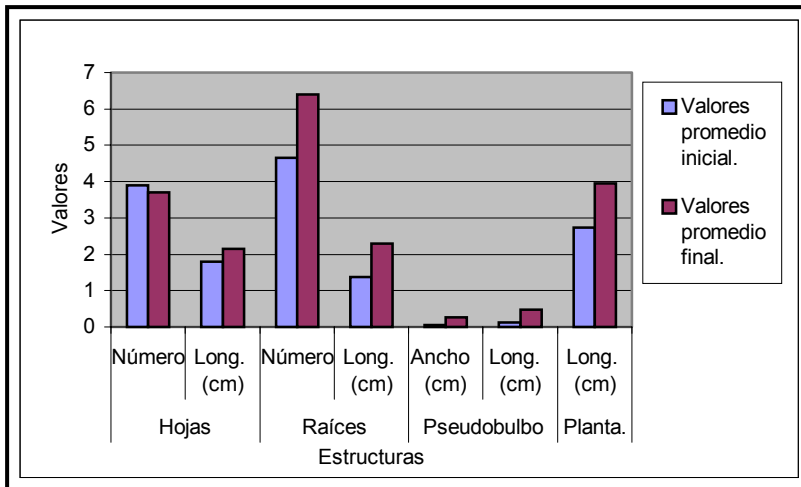
Con respecto a la mezcla 2 (esfagnum + agrolita + encino) en ésta se observaron incrementos en el desarrollo de estructuras (valores promedio) excepto en el número de hojas donde se registró una disminución, pero en general se puede afirmar que la mezcla fue adecuada para el desarrollo de las plantas, incluso se observó la presencia de pseudobulbos lo que significó una aclimatización óptima (Cuadro 7 y gráfica correspondiente).



Gráfica de cuadro 7. Crecimiento y desarrollo de estructuras en la aclimatización de *Prosthechea vitellina* en mezcla 2 (esfagnum + agrolita + encino).

	Hojas		Raíces		Pseudobulbo		Planta
	Número	Longitud (cm)	Número	Longitud (cm)	Ancho (cm)	Longitud (cm)	Longitud (cm)
Promedio I.	3.9	1.79	4.66	1.37	0.05	0.12	2.74
Promedio F.	3.71	2.15	6.4	2.29	0.257	0.47	3.95

Cuadro 8. Valores promedio de las plantas aclimatizadas en la mezcla 3 (esfagnum + encino + carbón).



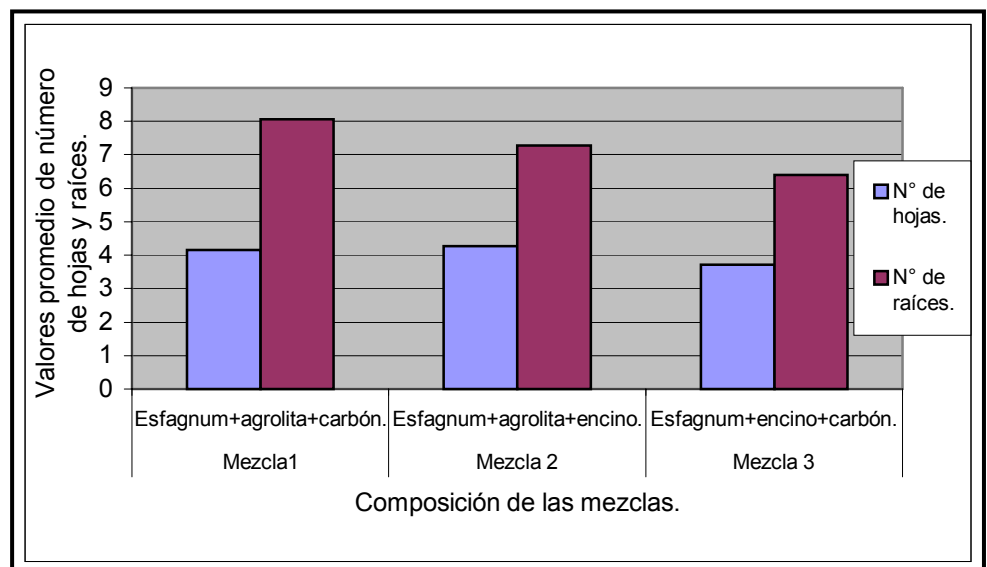
En la mezcla 3 (esfagnum + encino + carbón) también se obtuvieron valores mayores al final de la aclimatización con respecto a los valores iniciales tanto en número como en longitud de raíces y desarrollo de pseudobulbos. Por el contrario el número de hojas disminuyó. Sin embargo, la mezcla reunió características que favorecen el desarrollo de las plantas (Cuadro 8 y gráfica correspondiente).

Gráfica de cuadro 8. Estructuras generadas en la aclimatización de *Prosthechea vitellina* en mezcla 3 (esfagnum + encino + carbón).

	Mezcla1	Mezcla 2	Mezcla 3
Promedios.	Esfagnum+agrolita+carbón	Esfagnum+agrolita+encino	Esfagnum+encino+carbón
N° de hojas.	4.15	4.27	3.71
N de raíces.	8.07	7.27	6.4

Cuadro 9. Número de estructuras promedio producidas en la aclimatización de *Prosthechea vitellina* en tres mezclas experimentales.

Comparando la generación de estructuras en cada mezcla experimental, se estableció que en relación al número de hojas la mejor fue la mezcla 2 y la mezcla 1 fue la que indujo el mayor número de raíces. Por otra parte, en la mezcla 1 fue donde el incremento de longitud fue superior tanto de hojas, raíces y por ende de la planta (Cuadro 9 y su gráfica).



Gráfica de cuadro 9. Estructuras generadas en la aclimatización de plantas de *Prosthechea vitellina* en tres mezclas.

	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3
Promedios	Esfagnum+agrolita+carbón	Esfagnum+agrolita+encino	Esfagnum+encino+carbón
Longitud hojas (cm)	3.58	2.51	2.15
Longitud raíces (cm)	3.86	2.67	2.29
Longitud planta (cm)	7.57	5.06	3.95

Cuadro 10. Longitud final promedio de estructuras en la aclimatización de plantas de *Prosthechea vitellina* en tres mezclas experimentales.

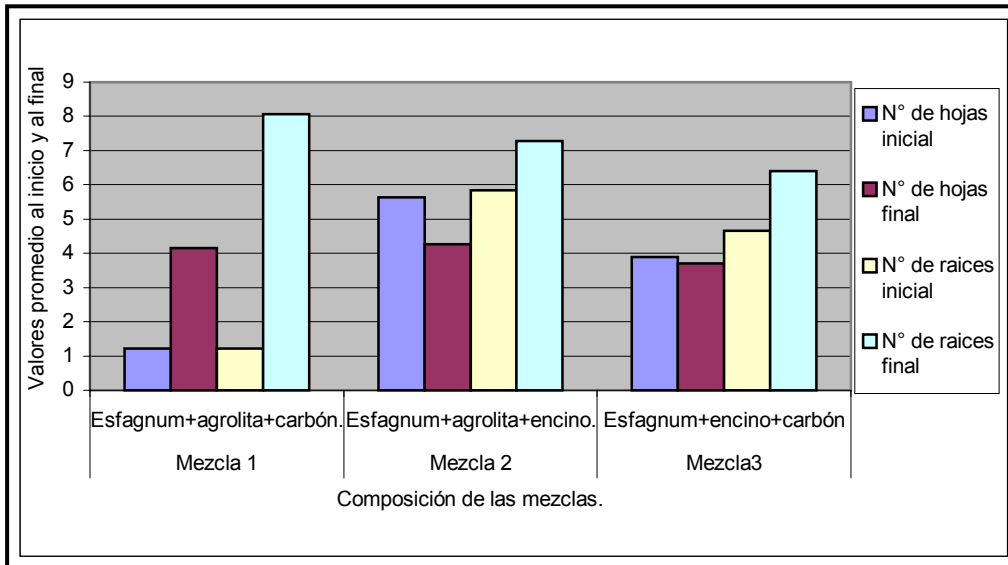
	M1	M2	M3
Hojas	12	53	39
Longitud	45	47	37
Raíces	12	53	46
Planta	87	77	64

Gráfica de cuadro 10. Crecimiento de estructuras producidas en la aclimatización de plantas de *Prosthechea vitellina* en tres mezclas.

	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3
Promedios	Esfagnum+agrolita+carbón.	Esfagnum+agrolita+encino.	Esfagnum+encino+carbón
N° de hojas inicial	1.22	5.63	3.9
N° de hojas final	4.15	4.27	3.71
N° de raíces inicial	1.22	5.83	4.66
N° de raíces final	8.07	7.27	6.4

Cuadro 11. Promedio de número de estructuras en la aclimatización de *Prosthechea vitellina* en tres mezclas.

Al comparar la generación de estructuras al inicio y al final de la aclimatización de *Prosthechea vitellina* en las tres mezclas, se estableció que es la mezcla 1 en la cual los valores promedio de número de hojas fue positivo, en las otras mezclas se observó un decremento. (Cuadro 11 y gráfica).

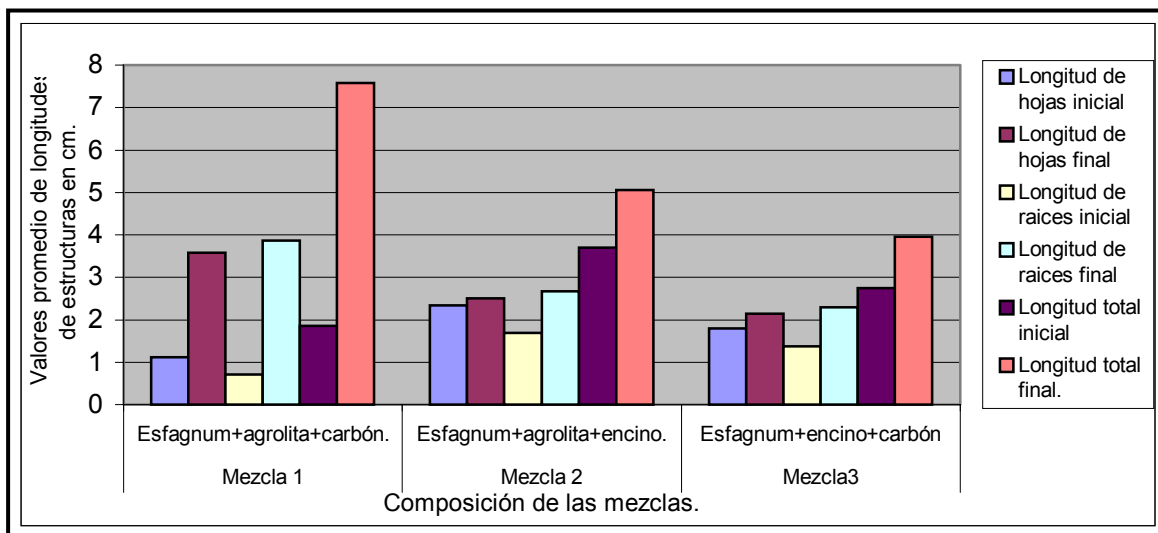


Respecto al número de raíces se incrementó éste independientemente de la mezcla experimental, pero la mezcla 1 indujo los mayores valores en promedio por lo que fue la mejor.

Gráfica de cuadro 11. Comparación de estructuras al inicio y al final de la aclimatación de *Prosthechea vitellina* en tres mezclas.

	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3
Promedios.	Esfagnum+agrolita+carbón.	Esfagnum+agrolita+encino.	Esfagnum+encino+carbón
Longitud de hojas inicial (cm)	1.12	2.34	1.79
Longitud de hojas final (cm)	3.58	2.51	2.15
Longitud de raíces inicial (cm)	0.71	1.69	1.37
Longitud de raíces final (cm)	3.86	2.67	2.29
Longitud total inicial (cm)	1.85	3.7	2.74
Longitud total final (cm)	7.57	5.06	3.95

Cuadro 12. Longitud promedio de las estructuras durante la aclimatación de *Prosthechea vitellina* en tres mezclas.



Gráfica del cuadro 12. Crecimiento de estructuras al inicio y al final de la aclimatación de *Prosthechea vitellina*.

En la longitud de las estructuras de las plantas completas la mezcla 1 fue superior, como lo manifiestan los valores que se presentan en el (cuadro 12 y la gráfica).

Sin embargo, es necesario tomar en cuenta las necesidades de la especie con la cual se trabaja y las características cualitativas y de manejo que reúne cada una de las mezclas descritas anteriormente, para así seleccionar la que proporciona realmente las mejores ventajas tanto para el desarrollo de las plantas como de disponibilidad, manejo y control.

Para el trasplante a sustrato de las plantas producidas *in vitro* muchos autores utilizan mezclas (Vazquez, 1994; Shiau *et al.*, 2005) y otros utilizan con éxito sustratos individuales como Goh (1990) quien utilizó fragmentos de carbón para híbridos del género *Aranda* con respecto a las mezclas de sustratos Pierik (1987), señala que las mejores mezclas contienen esfagnum, vermiculita y perlita o esfagnum vermiculita y arena. Bonga y Durzan (1982), recomiendan un sustrato compuesto principalmente de corteza de pino, esfagnum y cenizas señalando que la composición del sustrato influye grandemente en la sobrevivencia de las plantas.

Monk (1995), señala que un sustrato adecuado es la fibra de osmunda (raíz fibrosa del género *Osmunda*) pero este es virtualmente imposible de conseguir en la actualidad. La mezcla más comúnmente usada en la actualidad está basada en esfagnum y corteza de cedro rojo pero una mezcla de tres partes de perlita y dos partes de vermiculita es lo más recomendable para trasplantar plántulas inmediatamente después de extraerse de los frascos *in vitro* esta mezcla es de fácil adquisición y barata. Por otra parte señala que más importante que la composición de la mezcla es el riego ya que un régimen pobre o incorrecto dañará a la planta. Stenberg y Kane (1998), señalan que la composición de la mezcla de sustratos afecta la producción de hojas, la producción de brotes, la longitud de brotes, raíces y el peso fresco de plántulas producidas *in vitro* de *Encyclia boothiana* var. *Erythronioides*. Shu-Fung *et al.*, (2004) reportan el trasplante de plántulas de *Dendrobium tosaense* encontrando que la mezcla más adecuada fue una combinación de musgo esfangíneo y maquique.

Shiau, *et al.*, (2005) para el trasplante de *Haemaria discolor* utilizaron una mezcla de esfagnum-vermiculita-perlita (1:1:1), logrando una tasa de aclimatización del 96% después de cuatro meses de incubación mencionando que estas mantuvieron una similaridad morfológica con aquellas que crecieron en campo y que ésta técnica de germinación y desarrollo *in vitro* produjeron plantas sanas susceptibles a la replantación en su hábitat natural o cultivo en gran escala para su utilización ornamental o de extracción de productos farmacéuticos.

Las mezclas de sustratos actualmente utilizadas son inertes por lo cual obligan a utilizar algún tipo de nutrición artificial. Las orquídeas son de requerimientos nutricionales bajos por lo que las raíces se pueden dañar si se aplican cantidades altas de fertilizantes o bien si se dejan acumular sobre la mezcla.

Granada (1985), señala que una mezcla adecuada de sustratos debe de ser porosa, con buen drenaje, buena aireación y con un pH adecuado.

En la aclimatización de *Prosthechea vitellina* se tomó en cuenta las condiciones naturales del sustrato en que se encuentran las plantas, conociendo los requerimientos de las mismas fue posible obtener una gran cantidad de plantas aclimatizadas sanas, vigorosas con estructuras muy desarrolladas algunas con pseudobulbos y con formación de nuevas estructuras funcionales. Haciendo una comparación de los trabajos arriba citados coincidimos en gran medida con la utilización de los sustratos formando mezclas para buscar la más adecuada para la especie y se considera haber obtenido muy buenos resultados.

### 5.3.2 Recipientes de siembra.

En la aclimatización de plantas de *Prosthechea vitellina* a condiciones de invernadero se utilizaron botellas de plástico de polietileno poliestalato (PET) transparentes de reciclaje, con el fin de buscar un sistema para el trasplante *ex vitro*. Por lo común éste se realiza en macetas de plástico, cubiertas de una bolsa de polietileno transparente que se sujeta con una liga y se sostiene con palos largos de madera, lo que da buenos resultados pero resulta laborioso y poco práctico.

Buscando optimizar el tiempo, la economía y facilitar el trabajo se pensó en aprovechar éstos envases como recipientes para la siembra *ex vitro*, en un principio se utilizaron las botellas completas con tapa para proporcionar condiciones de alta humedad relativa a las plantas (Fig. 26 a y b), posteriormente se hicieron cortes transversales parciales lo que disminuyó la humedad, y finalmente funcionaron como macetas (Fig.27 y 28). Las botellas dieron muy buen resultado porque fueron de fácil obtención y prácticas en su manejo; por su material y forma se lavaron, cortaron y perforaron con facilidad, otra ventaja fue que por provenir del reciclaje no implicaron un gasto extra.

Durante el periodo de aclimatización (seis meses) se mantuvieron niveles de humedad adecuados para las plantas debido a que en un principio se formó un micro-invernadero dentro de cada botella, misma que permitió disminuir gradualmente la humedad abriendo parcialmente desde el momento de la siembra hasta los ocho días tiempo en que se retiraron totalmente las tapas.

(a).



(b).



Figs. 26 a) y b). Siembra de plantas de *Prosthechea vitellina* en botellas para su aclimatización a condiciones de invernadero en sustrato.

Se observaron diariamente las plantas y se evitó el hacer cambios de ambiente demasiado bruscos para las plantas, resultó muy adecuado hacer cinco perforaciones de 0.5 cm. de diámetro c/u, en la base de las botellas lo que proporcionó un buen drenaje y aireación al sustrato sin afectar las plantas. Por otra parte el riego fue mucho más sencillo porque se tuvo acceso por la parte superior de la botella lo que permitió aplicar solo la cantidad necesaria de agua, también se facilitó el sumergirlas para regar por inmersión ya sea para riego o en caso de necesitarlo para hacer un lavado de sales acumuladas en el mismo, cabe mencionar que cuando el sustrato fue muy ligero (esfagnum y agrolita) al sumergir tanto el sustrato como las plantas tienden a flotar dentro de la botella y se desacomodaron, por lo que fue



Fig. 27. Plantas de *Prosthechea vitellina* de invernadero en sustrato de esfagnum + corteza de encino + agrolita

necesario en éstos casos tener especial cuidado en no sumergirlas en cantidades muy grandes de agua, fuera de éste inconveniente con sustratos más pesados (encino, carbón) no se tuvo ninguna otra complicación, también se facilitó la fertilización por medio de solución nutritiva, ya que su aplicación se facilitó como el riego.



Este sistema permitió una iluminación uniforme para todas las plantas, al utilizar recipientes del mismo tamaño se proporcionó la misma área para una adecuada exposición a la luz.



Fig. 28. Plantas de *Proschechea vitellina* aclimatizadas en invernadero en mezcla de esfagnum + corteza de encino + agrolita.

En cada recipiente se colocaron dos y hasta tres plantas según su tamaño, se rotaron en las diferentes zonas de exposición para proporcionar condiciones equivalentes a todas las plantas.

En estos recipientes resultó práctico organizar, rotular, transportar, manipular, regar, fertilizar y observar las plantas llevando así un control adecuado de su desarrollo, se detectó rápidamente la aparición de alguna enfermedad o plaga y si se requería atención o cambios en alguno de los tratamientos.

Otra cualidad importante de los recipientes fue que en éstos, la temperatura (10-25°C) se mantuvo dentro de los rangos adecuados para el desarrollo del sistema radical como del sistema foliar de las plantas (Fig. 29). El material plástico de las botellas por ser transparente y muy delgado mantuvo a las mezclas de sustratos a la temperatura del invernadero.



Fig. 29. Plantas de *Proschechea vitellina* en mezcla de esfagnum + corteza de encino + carbón activado.

Las paredes transparentes permitieron observar la condición del sustrato, un inconveniente de las botellas fue su ligereza por lo que se volteaban cuando estaban vacías, el inconveniente fue mínimo y se controló fácilmente. Con base en ésta experiencia se demostró ampliamente que la utilización de las botellas como micro-invernaderos es una alternativa altamente eficaz, eficiente y económica para efectuar la aclimatización de plántulas de orquídeas, las botellas de reciclaje no necesitaron la adaptación de domos humidificadores, no requirieron de la utilización de bolsas de plástico, sino que por su forma y material rígido mantiene un ambiente cerrado y parcialmente cerrado según las condiciones requeridas por las plantas, manteniéndolas protegidas.

Monk (1995), señala que las orquídeas pueden crecer en diferentes tipos de recipientes y que cada uno tiene características favorables y desfavorables,. Las macetas de barro son pesadas y se secan rápidamente, son caras y generalmente tienen que romperse para el trasplante si las raíces están adheridas ellas.

Las macetas de plástico son baratas de alta disponibilidad y las plantas se remueven fácilmente para el trasplante. El problema es que retienen una gran cantidad de agua y se generan problemas de pudrición si el riego no es adecuado por lo que es necesario perforarla con hoyos de mayor tamaño. El tipo de maceta más recomendable por lo tanto, es el de plástico. A este respecto Stemberg y Kane (1998) utilizaron para el trasplante macetas comerciales de plástico con domos humidificadores. Appukuttan *et al.*, (1999) utilizó para el trasplante de la orquídea *Ipsea malabarica* macetas de barro. Shu, *et al.*, (2004) utilizaron macetas comerciales de plástico. Shiau, *et al.*, (2005) utilizaron macetas comerciales de plástico cubiertas con una bolsa de plástico.

#### 5.4. Acclimatización de las plantas germinadas *in vitro* a condiciones naturales.

##### 5.4.1 Liberación de plantas en campo.

Las plantas fueron llevadas a un bosque nublado lluvioso de pino y encino, localizado entre el km 11½ y 13 de la carretera Hueyनाupan, en Huauchinango, Puebla. a una altitud de 1839 m a una latitud 532,260 Latitud norte y 2,081,344 longitud oeste considerada adecuada para la liberación de las plantas de este estudio, ya que la planta madre procedía de esta área.

a).



b).



Figs.30. a). b). c). Exploración en campo de la zona de liberación de plantas de *Prosthechea vitellina*.

c).



Se exploró la zona de liberación para establecer el grado de perturbación, que estuviera aislada de poblados y de tránsito de animales de pastoreo, que contuviera vegetación arbustiva y arbórea abundantes y que fuera de difícil acceso (Figs.30 a); 30 b); y 30 c).

Se buscaron las condiciones ambientales adecuadas para *Prosthechea vitellina* como alta humedad, ausente de corrientes de vientos, con radiación solar no incidente de forma directa.

La zona elegida se caracterizó por tener suelos volcánicos con una inclinación aproximada de 30° con gran cantidad de materia orgánica, con helechos arborescentes, árboles de pino y encino de más de 10 m de altura y con un diámetro mínimo de 60 cm a la altura del pecho, asociados con plantas epífitas tales como bromelias, helechos, musgos, líquenes y orquídeas, etc. sin perturbación y sin evidencia de plagas ni hormigas.

b).



a).



Figs. 31. a y b. Plantas de *Prosthechea vitellina* en rama de encino liberadas en campo.

Se transportaron a campo 210 plantas aclimatizadas en el invernadero durante seis meses las plantas presentaban estructuras desarrolladas completas algunas ya con pseudobulbo (Figs. 31 a y b).



Fig. 32. Liberación de plantas de *Prosthechea vitellina* en una zona natural.

En la zona de liberación se amarraron al tronco principal en forma vertical las ramas con las plantas de *Prosthechea vitellina* en árboles de encino (Fig. 33) con una distancia entre ellos de 4 a 6 m, a una altura aproximada de unos 4 a 5 m para que la maleza ó los arbustos no las cubrieran y los animales del suelo no las alcanzaran, se amarraron firmemente con cuerdas de fibra natural sin lastimar las plantas, cuidando que no quedaran a la vista y resguardadas de las corrientes de agua de los escurrimientos que pudieran arrastrarlas y de los fríos vientos de la zona (Figs. 33 y 34).



Figs. 33 y 34. Plantas colocadas en ramas de encino amarradas al tronco de árboles de encino



Figs. 35 y 36. Ramas de encino sin plantas de *Prosthechea vitellina* a seis meses de liberadas en campo.



Fig. 37. Ramas de encino sin plantas de *Prosthechea vitellina* a seis meses de liberación.

Después de seis meses se regresó al área de trasplante para evaluar la sobrevivencia y adaptación de las plantas. Se encontraron las ramas de encino portadoras de las plantas en el mismo lugar y posición como se habían dejado, (Figs. 35, 36 y 37) bien amarradas e intactas evidenciando que no hubo intervención humana o de animales de pastoreo.

Las ramas presentaban el crecimiento de musgo sobre ellas y depósitos de hojarasca de los árboles circundantes en las oquedades formadas entre las bolsas contenedoras de las plantas. Las ramas fueron retiradas de los árboles (Figs. 38 a, 38 b, 38c y 38 d) y transportadas al laboratorio para su análisis.

Al revisar las ramas portadoras se evidenció que las plantas de *Prosthechea vitellina* reimplantadas no se encontraban. Se examinó rama por rama encontrando que la mayoría de las bolsas que las contenían estaban completas, se hallaron algunas evidencias de plantas muertas (ver cuadro 13), no hubo rastros de hongos ni de putrefacción, sólo en una de las ramas se observó que fueron desgarradas las bolsitas al parecer por algún animal arbóreo, posiblemente una ardilla, pero el resto mantuvo hasta el hueco que ocupaban las plantas, se dedujo que por la evidencia manifiesta fueron pájaros los que extrajeron las plantas, y en otros casos fueron comidas en su totalidad por algún tipo de insecto ya que no se detectaron en el área hormigas o algún otro animal que pudiera extraerlas sin alterar la disposición de las bolsas, de los hilos, ni la tela de las mismas, el esfagnum de las bolsitas tenía buena humedad y estaba totalmente limpio, incluso la mayoría del musgo que las recubría estaba vivo y húmedo.

38 a).



38 b).



38 c).



38 d).



Figs.38 a); b); c); y d). Situación en que se encontraron las ramas de encino que portaban las plantas de *Prosthechea vitellina* después de seis meses de liberadas en campo.

Se encontraron dentro de algunas bolsitas algunas larvas, once organismos adultos y un juvenil de insectos entre los cuales hay coleópteros terrestres voladores, crustáceos que por lo general son de sitios de alta humedad y dos especies de arañas etc., (Cuadro 14).

Estructura encontrada	Rango 1	Rango 2	Rango 3	Totales
Planta completa vivas c/ brote.	2	0	0	2
Raíz viva y sana separada de la planta.	2	1	0	3
Planta muerta deshidratada.	1	1	3	5

Appukuttan, *et al.*, (1999) reportan el establecimiento exitoso (79%) de la orquídea amenazada *Ipsea malabarica* mediante el trasplante a campo de plántulas con y sin tubérculo, llevando a cabo el registro de sobrevivencia al año siendo el único parámetro registrado.

Cuadro 13. Resultados obtenidos de las plantas liberadas en campo de *Prosthechea vitellina* después de seis meses.

Ellos señalan que son posibles las prácticas de conservación de esta orquídea a través de la multiplicación *in vitro* y reintroducción en más de una localidad.

Seeni y Latha (2000), reportan un éxito del 70-80% en el reestablecimiento en campo de la especie de orquídea amenazada *Vanda coerulea*, no mencionando la causa de muerte de las plantas ni los factores ambientales ni biológicos que prevalecían en el área sólo mencionan que las plantas a reintroducir deben de estar bien establecidas y replantadas en la época de lluvias para asegurar la tasa más alta de sobrevivencia.

Decruse, *et al.*, (2003) lograron la ecorestauración de *Vanda spathulata* cuyas plantas fueron sujetadas a troncos y ramas y monitoreadas por dos años. La sobrevivencia fue del 43.4 y 79% según la zona, no registrándose las causas de la pérdida ó muerte de las plantas, las sobrevivientes formaron raíces y hojas en los primeros cuatro meses, los autores mencionan que la ecohabitación con plantas micropropagadas es una herramienta muy eficiente para implementar la conservación *in situ* de especies de orquídeas.

Estadio.	Clase.	Orden.	Suborden.	Familia.	Género.	Especie.
Juvenil	Diplopodo	Chordeomida				
Adulto	Crustácea	Isópoda	Onícida			
Adulto		Coleóptera		Tenebrionidae		
Adulto		Coleóptera		Staphylinidae		
Adulto		Coleóptera		Eratylidae		
Adulto		Coleóptera		Cerambycidae	Plagionotus astecus (Chev.)	
Adulto				Aracnidae		
Adulto				Aracnidae		

Cuadro 14. Registro de los organismos encontrados en el sustrato a los seis meses de la liberación las plantas de *Prosthechea vitellina*.

Es importante señalar que en ninguno de los estudios de ecohabitación citados en la literatura se reporta la pérdida, desaparición (o muerte) total de las plántulas liberadas en campo, esto induce a la necesidad de efectuar estudios acerca de la relación planta hábitat y planta-organismos autóctonos para conocer y entender las interacciones y presiones a las cuales estará sujeta una plántula producida *in vitro* y liberada en campo, como es el caso de *Prosthechea vitellina* (Cuadro13) independientemente de que la pérdida de las plantas casi fue total se considera que aportó conocimientos acerca de la liberación de las plantas y los factores que intervienen en su adaptación, además de las circunstancias que se tienen que tomar en cuenta en trabajos posteriores para que las plantas tengan éxito en esta importante etapa para las plantas producidas *in vitro*.

## 6. CONCLUSIONES

Se determinó que la germinación asimbiótica *in vitro* de *Prosthechea vitellina* es un proceso simple, de larga duración (10 meses) y que pasa por ocho estadios de desarrollo ontogénico desde semilla hasta planta completa.

Se determinó que la presencia de luz no inhibe la germinación *in vitro* de *Prosthechea vitellina* y favorece el desarrollo de las plantas.

Los protocormos de *Prosthechea vitellina* tienen un gran potencial morfogénico, ya que de manera espontánea se desdiferencian y siguen diversas rutas morfogénicas como la formación de embriones somáticos y la producción de plantas completas.

La germinación asimbiótica *in vitro* de *Prosthechea vitellina* asegura la producción de individuos heterocigotos y la conservación del germoplasma.

El estudio de la germinación asimbiótica *in vitro* de *Prosthechea vitellina*, nos permitió conocer los estadios de su desarrollo ontogénico y la morfología de cada uno de ellos, y el potencial de propagación por semilla.

En este estudio se sentaron las bases técnicas y metodológicas para producir plantas de *Prosthechea vitellina* en forma masiva para su comercialización y ecorehabilitación.

Se estableció que el medio nutritivo Murashige y Skoog es adecuado para la germinación de semillas de *Prosthechea vitellina* ya que promovió el crecimiento y desarrollo de los protocormos y plántulas y en ninguna de sus etapas de desarrollo resultó tóxico ni perjudicial.

Se demostró que las plantas de *Prosthechea vitellina* germinadas *in vitro* son frágiles sin embargo mostraron una alta resistencia al estrés y un gran potencial de adaptación desarrollando rápidamente su capacidad autotrófica.

La aclimatización de las plantas de *Prosthechea vitellina* es un paso crítico ya que requiere especial atención, un trato meticuloso y las condiciones ambientales adecuadas.

Se estableció que el desarrollo ontogénico de *Prosthechea vitellina* es un proceso largo ya que las plantas producidas *in vitro* después de tres años siguen en un estado juvenil.

Se logró la aclimatización de *Prosthechea vitellina* a condiciones de invernadero.

Las plantas de *Prosthechea vitellina* presentaron un mejor desarrollo y adaptación en las mezclas que contenían corteza de encino y esfagnum ya que en estos sustratos las raíces crecieron mejor y se adhirieron a las partículas de la corteza.

La utilización de mezclas de sustratos permite agrupar de manera práctica una serie de características que se acerquen a las más adecuadas para favorecer el desarrollo de una especie, por lo que se considera importante poner a prueba el mayor número posible de mezclas de diferentes sustratos, ya que mezclados tienen un comportamiento distinto, el cual hay que conocer y saber aprovechar.

La aclimatización de plantas de *Prosthechea vitellina* a condiciones de invernadero mediante el procedimiento de trasplante en micro-invernaderos en botellas plásticas de reciclaje, es un método altamente eficaz que permite el paso de condiciones *in vitro* a *ex vitro* con gran éxito.

El ensayo de trasplante a condiciones naturales de plantas generadas *in vitro*, permitió visualizar más ampliamente los factores que intervienen en la sobrevivencia de las plantas en el medio natural, como son los depredadores naturales.



---

## 7. EXPECTATIVAS.

El presente trabajo aporta las bases necesarias para la producción masiva de plantas de *Prosthechea vitellina*, para comercializarlas y apoyar a la gente cuya forma de vida es la venta de orquídeas, y aliviar las presiones que existen sobre las poblaciones silvestres.

Otra expectativa es que queda abierta la posibilidad de seguir haciendo estudios sobre la forma de adaptar plantas de *Prosthechea vitellina*, en su hábitat natural exitosamente con el fin de repoblar zonas naturales o utilizarlas en trabajos de restauración.

También se hace necesario, continuar haciendo investigación en otros aspectos sobre la misma especie y muchas otras más, utilizando este trabajo como una pequeña guía para seguir ensayando con nuevas técnicas de adaptación a invernadero y liberación en campo.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, A., P. y Vatsala.** 1981. Introduction to Orchids Tropical. Tropical Botanic and Research Institute. Trivadium 695011. India. 11-180.
- Ackerman, D. J.** 1998. Evolutionary Potential in Orchids: Patterns and Strategies for Conservation. *Selbyana* 19(1): 8-14.
- Alexander, C., y Hardley, G.** 1984. Carbon movement between host and mycorrhizal endophyte during the development of the orchid *Goodyera repens* Br. *New Phytol.* 101: 657-665.
- Alpi, A. y Tognon, F.** 1991. Cultivo en Invernadero. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 211-246.
- Ammirato, P. V., W. R. Sharp., Evans R. D., y Y. P. S. Bajaj.** 1990. Hand Book of Plant Cell Culture. Vol. 5: 25-43, 598-637, 638-651. Mc Graw Hill Publishing Company. U.S.A.
- Arditti, J.** 1977a. Clonal propagation of orchids by means of tissue culture: a manual. 203-293 in J. Arditti (ed.) *Orchid Biology: Reviews and Perspectives. I.* Cornell University Press. Ithaca. New York.
- Arditti, J.** 1977b. *Orchid Biology. Reviews and Perspectives, I.* Ithaca, New York. Cornell University. Press. 203-293.
- Arditti, J.** 1979. Aspects of the physiology of orchids. *Adv. Bot. Res.* 7: 422-665.
- Arditti, J.** 1984. *Orchid Biology. Reviews III.* Cornell University Press. London. 177-222.
- Arditti, J.** 1987. *Orchid Biology Reviews and Perspectives IV.* Comstock Publishing Associates. USA. 64-185, 228-253.
- Arditti, J. y Ernst R.** 1984. Physiology of germinating orchid seeds. In J. Arditti (ed.) *Orchid Biology: Reviews and Perspectives III.* Cornell University Press. Ithaca. New York. 177-222.
- Arditti, J.** 1992. *Fundamentals of Orchid Biology.* John Wiley & Sons Inc. USA. 487-488, 504-549.
- Asociación, Altaverapacense de orquideología.** 1993. *Las orquídeas guía práctica para su cultivo.* Coban, Alta. Verapaz. 12-30.
- Barba, A. A., Luna R. S. y Romero A. J.** 2002. *Orquideología Básica.* Biotemas. Unidad de Investigación en Biología Vegetal. FES-Zaragoza. UNAM. 18.
- Bechtel, H., Cribb P., Launert E.** 1986. *The Manual of Cultivated Orchids Species.* The MIT PRESS Cambridge. Massachusetts. USA. 585.
- Birkhauser, V. B.** 1991. *Orchids from the Botanical Register.1815-18-47.* Printed Samuel Springer. Germany. 168.
- Britt, J.** 1999. *The Status of the Commercial Production of Potted Orchid Around the World.* The Rod McLellan Co., 914 South Claremont St., San Mateo, CA 94402-1834
- Burgeff, H.** 1936. *Samenkeimung der Orchideen und Entwicklung hrer Keimpflanzen.* Gustav Fischer, Jena.
- Camarillo J. L. y Rivera A. F.** 1990. *Áreas Naturales Protegidas en México y Especies en Extinción.* UNAM. México.D. F. 155-172.
- Caneva, S.** 1978. *Orquídeas Principales Géneros y Especies su Cultivo.* Albatros Silvio Caneva. Buenos Aires. 5-41, 220-226.
- Curtis, J. T.** 1999. The germination of some native orchid seeds. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 5: 42-47.

- Chávez, A., V. M.** 1980. Cultivo Asimbiótico de *Bletia urbana* Dressler (Orchidaceae) especie endémica del Pedregal de San Angel. Tesis de Biólogo de la UNAM. México. D.F. 81.
- Decruse, S.W., Gangaprasad A., Seeni, S., and Sarojini, M.,V.** 2003. Micropropagation and ecorestauracion of *Vanda spathulata*, and exquisite orchid. Plant Cell. Tissue and Organ Culture 72. Netherlands. 199-202.
- Del Castillo, N, y D. J. Ackerman.** 1992. Las Orquídeas de Puerto Rico y las Islas Vírgenes. Universidad de Puerto Rico. Pto Rico, 18-27.
- Dijk, E. y Eck D. N.** 1995. Effects of mycorrhizal fungi on *In vitro* nitrogen response of some dutch indigenous Orchid Species. Journal Botanic of Canada. 73: 1203-1211.
- Dressler, L. R.**1971. Una reconsideración del género *Encyclia*. Orquídea. Noviembre. México. D. F. 10-27.
- Dressler, L. R. y Pollard E. G.** 1974. El género *Encyclia* en México. Asociación Mexicana de Orquideología. A. C. México. D. F. 3-36, 77.
- Dressler, L. R.** 1981a. The orchids. Harvard University Press. London England. 1-73.
- Dressler, L. R.** 1981b. The Orchids Natural History and Classification. Harvard University Press. London England. 1-21, 148-203.
- Dodson, H. C.** 1972. Significado de los Estudios Sobre la Polinización de las Orquídeas. Orquídea. Abril. México. D. F. 89-93.
- Downie, D. G.,** 1943. Source of the symbiont of *Goodyera repens*. Trans. Proc. Bot. Soc. Edimb. 33: 383-390.
- Easton, A.** 2002. Reflections on Potting Orchids. The Magazine of the American Orchid Society. Febrero. 130-137.
- Espejo, S. A. y López F. A R.** 1997. Las Monocotiledóneas Mexicanas. Colegio Nacional de la Flora. UAM Iztapalapa. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). México. D. F. 45-46.
- Ernst, R., Arditti J. y Hearley L. P.** 1967. Effect of carbohydrate selection on the growth rate of freshly germinated *Phalaenopsis* and *Dendrobium* seed. American Orchid Society Bulletin 36: 1068-1073.
- Ernst, R., Arditti J. y Hearley L. P.** 1970. The nutrition of orchid seedlings. Am. Orchid Soc. Bull. 39: 599-605, 691-700.
- Ernst, R., Arditti J. y Hearley L. P.** 1971. Carbohydrate physiology of orchid seedlings. II. Hydrolysis and effects of oligosaccharides. Am. J. Bot. 58(9): 827-835.
- Espinosa, M. A.** 1997. Fertilización Química y Biológica de Tres Híbridos de Orquídeas en Condiciones de Invernadero. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, México. 111.
- Freson, R.** 1969. Action du glucosa sur des protocormes de *Cimbidium* Sw. (Orchidaceae) cultivés *in vitro*. Bull. Soc. R. Bot. Belg. 102: 205-209.
- Gamborg, O. L., Murashige T. , Thorpe T. A. y Vasil I. K.** 1976. Plant tissue culture media. *in vitro* 12 (7). 473-478.
- Gangaprasad, A. N., Decruse S. W., Seeni S. and Menon S.** 1999. Micropropagation and restoration of the endangered Malabar Daffodil, Orchid *Ipsea malabarica*. Lindleyana 14(1).

- Gómez, P. A.** 1998. La conservación de la biodiversidad en México: mitos y realidades. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 63: 33-41.
- Goh, C. J., and Karalgian, L. G.** (1989). Orchid industry in Singapore. Econ. Bot. 43(2), 241-254.
- Gravel, H.** 1989. Étude de la germination et des premières étapes de la morphogenèse du *Cypripedium reginae* Walt. (Orchidaceae). Mémoire de maîtrise, Université de Montréal, Montréal.
- Grell, E., Haas-von Schmude N. F., Lamb A. Y Bacon A.** 1988. Re-Introducing *Paphiopedilum rothschildianum* to Sabah, North Borneo. American Orchid Society Bulletin. 57(11), 1239-1249.
- Grout, B. W. W. y Aston, M. J.** 1977. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. Horticultural Research. 17.
- Hágsater, E., Salazar A. G.** 1990. Icones Orchidacearum. Asociación Mexicana de Orquideología A. C. Fascicle 1. México, D. F. 25.
- Hágsater, E. y Soto Arenas M. A.** 1998. Orchid Conservation in México. *Selbyana* 19(1), 15-19.
- Hardley, G.** 1984. Uptake of [<sup>14</sup>C]glucose by asymbiotic and mycorrhizal orchid protocorms. New Phytol. 96: 263-273.
- Hardley, G. y Purves, S.** 1974. Movement of <sup>14</sup>carbon from host to fungus in orchid mycorrhizas. New Phytol. 73:475-482.
- Harrison, R. Ch. y Arditti J.** 1970. Cultivo de Orquídea por Semilla. Orquídea. Abril. México. D. F. 81-89
- Harrison, C. R.** 1973. Physiology and ultrastructure of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae) germination. These de doctorat. University of California.
- Harrison, C. R.** 1977. Ultrastructural and histochemical changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). Botanic Gazette. 138: 41-45.
- Harrison, R. Ch. y Arditti J.** 1978. Physiological changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). Botanic Gazette. . 139: 180-189.
- Harvais, G. y Raitsakas A.** 1974. On the Physiology of a fungus symbiotic with orchids. Canada Journal Botanic. 53 II: 145-155.
- Hicks, A. J.** 2000. Asymbiotic Techniques of Orchid Seed Germination. Edited by Robert Huber. USA. 1-5 y 15-30.
- Hicks, A. J.** 2001. Propagating orchids. The Magazine of the American Orchid Society. 70(11) 1062-1066.
- Higgins, E. W.** 1997. A reconsideration of the genus *Prosthechea* (Orchidaceae). Phytologia. Mayo.82(5):370-383.
- Homés, J.** 1973. Modifications ultrastructurales des chloroplastes de protocormes d'Orchidées cultivés *in vitro* en présence de saccharose. J. Microsc. 17: 66a.
- Homés, J., et Vaséveren – Van Espen. N.** 1972. Structure des plastids de protocormos d'Orchidées cultivés *in vitro* á diverses concentrations en saccharose. J. Microsc. 14: 55a
- Homés, J., et Vaséveren – Van Espen. N.** 1973a. Effects du saccharose et de la lumière sur le développement et la morphologie de protocormes d'Orchidées cultivés *in vitro*. Bulletin Society. R. Botanique. Belg. 106: 89-106.

- Homés, J.**, et Vaséveren – Van Espen. N. 1973b. Quelques formes de plastes induites par le milieu de culture dans des protocormes cultivés *in vitro*. Bulletin Society R. Botanique Belg. 106: 117-121.
- Homés, J.**, Freson, R., Vermeylen, M., et Michel, M. 1971. Relations entre les conditions de culture et la morphogénese chez les protocormes d'Orchidées cultivés *in vitro*. 96° Congr. Natl. Soc. Savantes, Toulouse, 4: 86, 93-105.
- Jancke von H.** 1915. Wie wird am besten Cattleya- und Laelia- samen aufgehoben, und wie lange hält er sich keimfähig unter günstigen Bedingungen? Orchis 9: 3-4.
- Jonojit Roy.**, Nirmalya B. 2003. Induction of callus and plant regeneration from shoot-tip explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. Var. *oculatum*. H.K.f. Scientia Horticulturae 97.
- Kano, K.** 1965. Studies on the media for orchid seed germination. Mem. Fac. Agric. Kagawa Univ. 20: 1-67.
- Kishi, F.** y Takagi K. 1997. Analysis of medium components used for orchid tissue culture. Lindleyana. 12(3).
- Knudson, L.** 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. Botany Gazette, 73: 1-25.
- Knudson, L.** 1924. Further observations on nonsymbiotic germination of orchid seeds. Botanical. Gazette 77: 212-219.
- Knudson, L.** 1934. Storage and viability of orchid seed. American Orchid Society Bulletin. 2: 66.
- Knudson, L.** 1940. Viability of orchid seed. American Orchid Society Bulletin. 9: 36-38.
- Knudson, L.** 1953. Viability of orchid seed. American Orchid Society Bulletin. 22: 260-261.
- Koopowitz, H.** y Ward R. 1984. A technological solution for the practical conservation of orchid species. Orchid Advocate 10: 43-45.
- Larson, R. A.** 1988. Introducción a la Floricultura. AGT. Editor S.A. México. 119-146
- Larson, R. A.** 1992. Introduction to Floriculture. Academic Press, Inc. San Diego California. U.S.A. 115-142.
- Lee, Y.-I.** and Lee N. 2003. Plant regeneration from protocorm derived callus of *Cypripedium formosanum*. In Vitro Cell Des. Biology Plant 39: 475-479. September-October. Society for In vitro Biology.
- Leroux, G.**, Barabé D. y Vieth J. 1995. Morphogénese comparée de protocormes du *Cypripedium acaule* (Orchidaceae) cultivés *in vitro* avec ou sans sucre. Canada Jardin Botanique 73 Imprimé au Canada. 1391-1406.
- Limartha, I.** 1975. Influence of media and seed storage time on orchid germination. Hawaii Orchid J. 4: 6-8.
- Linsmaier, E. M.**, y F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18: 100-127.
- Lo, S. F.**, Nalawade S. M., Kuo, C. L., Chen, C. L. and Tsay, H. S. 2004. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense* Makino- a medicinally important orchid. In vitro Cell. Dev. Biology Plant 40. September-October.
- Luna, R. S.** y Barba A. A. 1995. Ecología General de las Orquídeas. Unidad de Investigación en Biología Vegetal, FES-ZARAGOZA UNAM. 2(1), 10-16.
- Manning, J.C.**, y van Standen, J, 1987. The development and mobilization of seed reserves in some African orchids. Aust. Journal Botanic. 35: 343-353.

- Martínez, P. A.** 1991. Propagación Masiva *in vitro* y Recuperación de Poblaciones de Orquídeas en Peligro de Extinción. Tesis de Maestría de la UNAM. México. D. F.
- Mckendrick, S.** 2000. Manual para la germinación *in vitro* de orquídeas. Ceiba Foundation for Tropical Conservation. Quito Ecuador. Marzo.
- Mc. Kenzie, B. P.** 1988. The Complete Book of Orchid Growing. Trafalgar Square Publishing North Pomfret. Vermont. 05053. USA. 71-72.
- Markovina, A-L and McGee P.A.** 2000. Comparison of symbiotic and asimbiotic seed germination and plantlet development in *Sarcochilus (Vandeeae; Orchidaceae)*. *Lindleyana* 15(2): 68-72.
- Murashige, T. y Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*. Abril. Vol. 15: 473-498.
- Murashige, T.** 1973. Nutrition of plant cell and organs *in vitro*. *In vitro*. 9.
- Niemann, D.** 2001. Orchid Propagation. The Magazine of the American Orchid Society. 70(5), 460-470.
- Noble, M.** 1991. You can grow *Cattleya* orchids. Jacksonville Florida. USA. 13-37.
- Obaidul, M. I., Matsui S. y Ichihashi S.** 2000. Effects of complex organic additives on seed germination and carotenoid content in *Cattleya* seedlings. *Lindleyana* 15 (2): 81-88.
- Owen, R. H. & Miller R.** 1992. An examination and correction of plant tissue culture basal medium formulations. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*. 28, 147-150.
- Padrón, H. S.,** 2006. Germinación Asimbiótica *In vitro* de *Govenia capitata* (Orchidaceae). Tesis de Biólogo de la UNAM. México. D. F.
- Perkins, A. J., G. Masuhara G., y P. a. McGee.** 1995. Specificity of the association between *Microtis parviflora* (Orchidaceae) and its mycorrhizal fungi. *Austral*.
- Plenchette, Ch.** 1982. Les endomycirhizes á vésicules et arbuscules (VA): un potentiel á exploiter en agricultura. *Phytoprotection*.
- Pontes, M.** 1972. Examinemos donde crece la *Encyclia vitellina*. *Orquídea*. Abril. 91-98.
- Pritchard, H. W. y Seaton P. T.** 1993. Orchid seed storage: historical perspective, current status, and future prospects for long-term conservation. *Selbyana* 14: 89-104.
- Pridgeon, M. A.** 1996. Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN. Orchids. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 3-22.
- Purves, S., y Hardley. G.** 1975. Movement of Carbon Compounds Between the Partners in Orchid Micorriza. *In Endomycorrhizas. Edited by F. E. Sanders. B. Mosse, and P. b: Tinker.* Academic Press Limited, London, 173-194.
- Ramírez, F. C.** 1990. Establecimiento de Cultivo *In vitro* de Orquídeas Mexicanas en Peligro de Extinción. Tesis Biólogo de la UNAM. México. D. F. 64.
- Rasmussen, H. N.** 1990. Cell differentiation and mycorrhizal infection in *Dactylorhiza majalis*. (Rchb. f.) Hunt. and Summeth. (Orchidaceae) during germination *in vitro*. *New Phytol.* 116: 137-147.
- Richardson, K. A., Peterson, R. L., et Currah. R. S.** 1992. Seed reserves and early symbiotic protocormo development of *Platanthera hyperborea* (Orchidaceae). *Canada Jardin Botany.* 70: 291-300.

- Rittershausen, W.** and Brian. 1989. Orchids as Houseplants. Ward Lock Limited London. House Editor Denis Ingram. 8-32. Printed and Bound in Portugal by Resopal.
- Ronse, A.** 1989. In vitro propagation of orchids and nature conservation: possibilities and limitations. Memorial Society. Royal Belg. 11: 107-113.
- Ronse, A.** y Hailes N. S. J. 1989. Effect of temperature and moisture content on the viability of *Cattleya aurantiaca* seed. Pp. 17-29 in H. W. Pritchard, ed., Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Rubluo, A.,** Chávez V. y Martínez A. 1989. *In vitro* seed germination and reintroduction of *Bletia urbana* (Orchidaceae) in its natural habitat. Lindleyana 4(2): 68-73.
- Sarma, K.S.,** Maesato k., Hara T., y Sonoda Y. 1990. Effect of method of agar addition on post-autoclave pH of the tissue culture media. *Annals of Botany*. 65, 37-40.
- Seaton, P. T.** 1985. Investigations to establish improved techniques for seed storage, germination and culture of seedlings of *Cattleya aurantiaca*. M. Phil dissertation, The Polytechnic, Wolverhampton, UK.
- Seaton, P. T.** y N. S. J. Hailes. 1989. Effect of temperature and moisture content on the viability of *Cattleya aurantiaca* seed. Pp.17-29 in H. W. Pritchard, ed., Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Seaton, P. T.** 2000. Growing orchids from seed. *Orchid Review*. 108. No 7235: 317-319.
- Shiau, Y.-J.,** Nalawade S.-M., Hsai C.-N., and Tsay H.-S. 2005a. Propagation of *Haemaria discolor* via *in vitro* seed germination. *Biologia Plantarum* 49((3). Departament of Agronomy, Agricultural Research Institute Wufong, Taichung 413,: 341-346. Taiwan.
- Shiau, Y.-J.,** Nalawade S.-M., Hsai C.-N., Vanisree M., and Tsay H.-S. 2005b. *In vitro* propagation of the Chinese medicinal plant, *Dendrobium candidum*. Wall. ex Lindl., from axenic nodal segments. *In vitro Cell. Dev. Biology- Plant* 41: 666-670. September-October.
- Shu,-F. L.,** Nalawade, S. M., Chao-L. K., Chung,-L. C., and Tsay, H. S. 2004. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense* makino- a medicinally important orchid. *In vitro Cell. Dev. Biology Plant* 60. September-October. 528-535
- Smith, S. E.** 1966. Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. *New Phytol.* 65: 488-499.
- Smith, S. E.** 1967. Carbohydrate translocation in orchid mycorrhizas. *New Phytol.* 66. 371-378.
- Stemberg, L. M.** y Kane E. M. 1998. *In vitro* seed germination and greenhouse cultivation of *Encyclia boothiana* var. erythronioides, an endangered Florida orchid. *Lindleyana*.13 (2) 101-112.
- Sutter, E.G.** 1981. Problems posed by microplant morphology. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 31.
- Sutter, E.G.** 1985. Morphological, physical and chemical characteristics of epicuticular wax on ornamental plants regenerated *in vitro*. *Annals of Botany*. 55.
- Thomas, W,** y Thomas B., and Johnston C. 1997. Orchid culture in perlite. *Orchid Digest*, Jan-Feb-Mar, 10-14.
- Thornihill, A.,** y Koopowitz H. 1992. Viability of *Disa uniflora* Berg (Orchidaceae) seeds under variable storage conditions: Is orchid gene-banking possible?. *Biological conservation*, 62, 21-27 USA.
- Tokuhara, K.** y Mii, M 2003. Highly efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of *Phalaenopsis* orchids by adjusting carbohydrate sources, *In vitro cell. Dev. Biol-Plant*. 39. 635-639.

- Uetake**, Y., Kobayashi, K., et Ogoshi, A. 1992. Ultrastructural changes during the symbiotic development of *Spiranthes sinensis* (Orchidaceae) protocorms associated with binucleate *Rhizoctonia* anastomosis group C. Mycol. Res. 96: 199-209.
- Vacin**, E. F., y Went. F. W. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. Botany Gazette 110: 605-613.
- Vanséveren** – Van Espen, N. 1973. Effects du saccharose sur le contenu en chlorophylles de protocormes de *Cymbidium* Sw. (Orchidaceae) cultivés *in vitro*. Bulletin Society Royal Botanique Belg. 106: 107-115.
- Van Waes**, J. 1984. In vitro studie van de kiemingsfysiologie van Westeuropese archideen. Dissertatie Fac. Landbouwwet. R. U. G.
- Vázquez**, V. S. 1994. Cambios Morfológicos, Anatómicos y Fisiológicos en Plantas Aclimatizadas de Anturio y Orquídeas. Tesis de Maestría de Colegio de Postgraduados. 77.
- Velásquez**, V. R. 1997. Efecto de Sacarosa, Glucosa y Fructuosa Sobre la Germinación de las Semillas, el Desarrollo y Crecimiento de Plántulas de *Laelia speciosa* (H.B.K.) SCHLTR. Cultivadas. Tesis de Biólogo de la UNAM. 63.
- Vertucci**, C. W. 1989. Effects of cooling rate on seeds exposed to liquid nitrogen temperatures. Plant Physiol. (Bethesda) 90. 1478-1485.
- Villalobos**, A. V. M. 1985. Fundamentos Teórico-prácticos de Cultivo de Tejidos Vegetales. Laboratorio de Biotecnología. Centro de Genética; Colegio de Postgraduados. Chapingo 56230. México. 161-211.
- Warcup**, J. H. 1959. Studies on basidiomycetes in orchids. *Britonia Mycology. Soc.* 42: 45-52.
- Wiard**, L. A. 1987. An introduction of the orchids of México. Cornell Univ. Press. USA. 65.
- Withner**, C. L. 1959. Orchid physiology. *Dans The orchid, a scientific survey. Éditeur: C. L. Withner.* Ronald Press, New York. 315-360.
- Withner**, C. L. y Kieger, R. E. 1985. The Orchids. Scientific Studies Publishing Company. Florida. USA. 224-245.
- Yu**, H., Goh J. C. 2001. Molecular genetics of reproductive biology in orchids. Plant Physiology, December. Vol. 127 (4), 1390-1393 Plant Growth and Development Laboratory, Department of Biological Sciences, Faculty of Science, National University of Singapore.
- Yue**, D., Y. Desjardins, M. Lamarre and A. Gosselin. 1992. Photosynthesis and transpiration of *in vitro* cultured asparagus plantlets. Scientia Horticulturae. 49: 9-16.
- Zettler**, W. L., Burkhead C J., and Marshall A. J. 1999. Use of mycorrhizal fungus from *Epidendrum Conopseum* To Germinate Seed of *Encyclia tampensis* *In vitro*. Lindleyana 14(2); 102-105. 1999.
- <http://www.orquideas-katia.com/castellano/Sustratos.htm>
- <http://www.orquidea.cl-cuidados-fertilizante.htm> (visita en Junio 2005)
- <http://www.orquidea.cl/contactenos.htm>. (visita en Junio 2005)
- <http://www.carbonapelsa.com.mx/pages/spanish/carbónactivado.html> (Visita en Mayo, 2005)
- <http://Tonatiu.com/notas/botánica/shagnum.html>
- (www.bgci.org.uk/congress/congress\_rio\_1992/retana.html).
- <http://www.multiperlita.htm>
- [www.teletica.com/archivo/7días/2002/06/flores.htm](http://www.teletica.com/archivo/7días/2002/06/flores.htm) (Visita en mayo 2005)
- E-mail: [publicaciones@humboldt.org.co](mailto:publicaciones@humboldt.org.co) (Visita en mayo 2005)
- Website: <http://www.humboldt.org.co>



*NORMA OFICIAL MEXICANA* (Visita Mayo del 2005)

NOM-059-ECOL-2001, PROTECCIÓN AMBIENTAL-ESPECIES NATIVAS DE MÉXICO DE FLORA Y FAUNA SILVESTRES–CATEGORÍAS DE RIESGO Y ESPECIFICACIONES PARA SU INCLUSIÓN, EXCLUSIÓN O CAMBIO-LISTA DE ESPECIES EN RIESGO.

(Publicada en el D.O.F. de fecha 06 de marzo de 2002)

<http://semades.jalisco.gob.mx/site/nom059eco/2001.htm>

<http://www.mosserlee.com> (Visita en mayo 2005).

[www.conabio.gob.mx/institucion/conabio\\_espanol/doctos/orquidea.html](http://www.conabio.gob.mx/institucion/conabio_espanol/doctos/orquidea.html) (Visita en Julio 2005)

<http://www.orquideas-katia.com/castellano/Sustratos.htm> Última actualización: viernes 29 abril, 2005

<http://www.orquidea.cl-cuidados-fertilizante.htm> (visita en Junio 2005)

<http://www.orquidea.cl/contactenos.htm>. (visita en Junio 2005)

## APÉNDICE I

## Medio nutritivo de Murashige - Skoog (1962)

Sales inorgánicas	(mg/l)
<b>Macronutrientes</b>	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370.0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.0
KNO <sub>3</sub>	1900.0
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440.0
<b>Micronutrientes</b>	
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	22.3
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25
KI	0.83
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8
<b>Constituyentes orgánicos</b>	
Myo-inositol	100.0
Tiamina HCl (B1)	0.4
Niacina	0.5
Piridoxina (B6)	0.1
Sacarosa	30 000.0
Agar gel	6 000.0
Ph	5.7

## APÉNDICE I I

### Equipo y material

- ❖ Geoposicionador.
- ❖ Altimetro
- ❖ Mapa cartográfico de la zona de estudio (1: 50,000).
- ❖ Vernier.
- ❖ Cristalería de laboratorio.
  - ❖ Balanza granataria.
  - ❖ Balanza analítica.
  - ❖ Autoclave.
  - ❖ Placa de agitación y calentamiento.
  - ❖ Potenciómetro.
  - ❖ Microscopio estereoscópico.
  - ❖ Microscopio óptico.
  - ❖ Instrumental quirúrgico.
- ❖ Tijeras para podar.
- ❖ Pala de jardinería.
- ❖ Sustratos (Agrolita, esfagnum, corteza de encino, carbón activado).
  - ❖ Botellas de plástico (PET).
  - ❖ Hilo de algodón, manta de cielo.

## APÉNDICE I I I

### Reactivos:

- ❖ Agua destilada.
- ❖ Solución de etanol al 70 %.
- ❖ Solución de hipoclorito de sodio al 6% v/v.
- ❖ Detergente líquido.
- ❖ Solución de Cloruro de trifenil tetrazolio al 1 %.
- ❖ Sales basales de micronutrientes Murashige y Skoog (SIGMA-M5524).
- ❖ Solución stock de piridoxina 10 mg/50ml.
- ❖ Solución stock de tiamina 10mg/50ml.
- ❖ Solución stock niacina 10mg/50ml.
- ❖ Myo-Inositol.
- ❖ Sacarosa.
- ❖ Agar-gel (Sigma).
- ❖ Benlate al 1 %, (BAYER).
- ❖ Fertilizante Folifértil (17,17,17).

**ANEXOS.****ANEXO 1****Diferencias entre número de hojas en la aclimatización en invernadero y cámara Tabla gráfica 1.**

Prueba de rango múltiple para DIF H por VIA

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD				
VIA	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
2	90	-3.86667	0.320406	X
1	65	-1.67493	0.433326	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
1 - 2		*2.19174		7.83771E-7

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

**Diferencias en la longitud de hojas en la aclimatización en invernadero y cámara Tabla de gráfica 2.**

Prueba de rango múltiple para DIF LH por VIA

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD				
VIA	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
2	90	-0.677778	0.0825754	X
1	65	0.0262678	0.111677	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
1 - 2		*0.704046		2.01994E-7

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

**Diferencias en el número de raíces en la aclimatización en invernadero y cámara Tabla de gráfica 3.**

Prueba de rango múltiple para DIF R por VIA

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD				
VIA	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
2	90	-1.02222	0.374518	X
1	65	-0.274929	0.506509	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
1 - 2		*0.747293		9.16139E-7

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

**Diferencias en la longitud total de las raíces en la aclimatización en invernadero y cámara Tabla de gráfica 4.**

Prueba de rango múltiple para DIF LR por VIA

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD				
VIA	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
2	90	-0.511111	0.100786	X
1	65	0.0462393	0.136306	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
1 - 2		*0.55735		2.46541E-7

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

**Diferencias en la longitud total de las plantas en la aclimatización en invernadero y cámara Tabla de gráfica 5.**

Prueba de rango múltiple para DIF LT por VIA

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD				
VIA	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
2	90	-1.09667	0.13815	X
1	65	0.373048	0.186838	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
1 - 2		*1.46972		3.3794E-7

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

**Diferencias en el número de hojas en la aclimatización por rangos Tabla de gráfica 6.**

Multifactor ANOVA - DIF H

Prueba de rango múltiple para DIF H por RANGO

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD				
RANGO	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
3	39	-5.32778	0.57762	X
1	56	-1.71795	0.407229	X
2	60	-1.26667	0.392416	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
1 - 2		*-0.451282		0.00000117697
1 - 3		*3.60983		0.00000147085
2 - 3		*4.06111		0.00000145331

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

**Diferencias en la longitud de las hojas en la aclimatización por rangos *Tabla de gráfica 7.***

Multifactor ANOVA - DIF LH

Prueba de rango múltiple para DIF LH por RANGO

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD				
RANGO	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
3	39	-0.877778	0.148865	X
2	60	-0.0766667	0.101134	X
1	56	-0.0228205	0.104951	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
1 - 2		*0.0538462		3.0333E-7
1 - 3		*0.854957		3.79069E-7
2 - 3		*0.801111		3.74548E-7

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

**Diferencias en el número de raíces en la aclimatización por rangos *Tabla de gráfica 8.***

Multifactor ANOVA - DIF R

Prueba de rango múltiple para DIF R por RANGO

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD				
RANGO	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
3	39	-2.74444	0.675172	X
1	56	-0.00128205	0.476004	X
2	60	0.8	0.458689	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
1 - 2		*-0.801282		0.00000137575
1 - 3		*2.74316		0.00000171926
2 - 3		*3.54444		0.00000169875

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

**Diferencias en la longitud de raíces en la aclimatización por rangos *Tabla de gráfica 9.***

Prueba de rango múltiple para DIF LR por RANGO

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD				
RANGO	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
3	39	-0.791667	0.181695	X
1	56	0.014359	0.128097	X
2	60	0.08	0.123437	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
1 - 2		*-0.065641		3.70226E-7
1 - 3		*0.806026		4.62668E-7
2 - 3		*0.871667		4.57149E-7

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

**Diferencias en la longitud total de las plantas en la aclimatización por rangos Tabla de gráfica 10.**

Prueba de rango múltiple para DIF LT por RANGO

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD				
RANGO	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
3	39	-1.45389	0.249054	X
1	56	0.111795	0.175586	X
2	60	0.256667	0.169199	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
1 - 2		*-0.144872		5.07478E-7
1 - 3		*1.56568		6.3419E-7
2 - 3		*1.71056		6.26625E-7

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

**ANEXO 2****Número de hojas inicial en la aclimatización en invernadero y cámara Tabla de gráfica A1.**

Prueba de rango múltiple para HI por VIA

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD				
VIA	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
1	90	6.48889	0.255143	X
2	90	7.47778	0.255143	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
1 - 2		*-0.988889		5.2464E-7

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

**Número de hojas al final de la aclimatización en invernadero y cámara Tabla de gráfica A2.**

Prueba de rango múltiple para HF por VIA

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD				
VIA	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
2	90	3.61111	0.211131	X
1	65	4.71111	0.285539	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
1 - 2		*1.1		5.16464E-7

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

**Longitud de las hojas al inicio de la aclimatización en invernadero y en la cámara Tabla de gráfica B1.**

Prueba de rango múltiple para LHI por VIA

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD				
VIA	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
2	90	2.35444	0.0668419	X
1	90	2.49778	0.0668419	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
1 - 2		*0.143333		1.37444E-7

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

**Longitud de hojas al final de la aclimatización en invernadero y cámara Tabla de gráfica B2.**

Prueba de rango múltiple para LHF por VIA

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD				
VIA	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
2	90	1.67667	0.0997104	X
1	65	2.7251	0.134851	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
1 - 2		*1.04843		2.4391E-7

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

**Número de raíces al inicio de la aclimatización en invernadero y cámara Tabla de gráfica C1.**

Prueba de rango múltiple para RI por VIA

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD				
VIA	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
1	90	5.38889	0.315044	X
2	90	6.33333	0.315044	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
1 - 2		*-0.944444		6.47813E-7

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.



**Número de raíces al final de la aclimatización en el invernadero y en la cámara Tabla de gráfica C2.**

Prueba de rango múltiple para RF por VIA

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD				
VIA	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
1	65	5.07265	0.420598	X
2	90	5.31111	0.310995	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
1 - 2		*-0.238462		7.6075E-7

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

**Longitud total de las raíces al inicio de la aclimatización en invernadero y en la cámara Tabla de gráfica D1.**

Prueba múltiple de rango para LRI por VIA

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD				
VIA	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
1	90	1.69333	0.0924945	X
2	90	1.92556	0.0924945	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
1 - 2		*-0.232222		1.90193E-7

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

**Longitud total de las raíces al final de la aclimatización en invernadero y cámara Tabla de gráfica D2.**

Prueba de rango múltiple para DIF\_H por VIA

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD				
VIA	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
2	90	1.41444	0.076855	X
1	65	1.88635	0.103941	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
1 - 2		*0.471909		1.88001E-7

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

**Longitud total de las plantas al inicio de la aclimatización en invernadero y en la cámara Tabla de gráfica E1**

Prueba de rango múltiple para LTI por VIA

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD				
VIA	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
1	90	3.61667	0.12956	X
2	90	3.64667	0.12956	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
1 - 2		*-0.03		2.66408E-7

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

**Longitud total de las plantas al final de la aclimatización en invernadero y en la cámara Tabla de gráfica E2.**

Prueba de rango múltiple para LTF por VIA

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD				
VIA	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
2	90	2.55	0.162773	X
1	65	4.35011	0.220139	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
1 - 2		*1.80011		3.98173E-7

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

**Número de hojas al inicio de la aclimatización por rangos Tabla de gráfica F1.**

Multifactor ANOVA - HI

Prueba de rango múltiple para HI por RANGO

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD				
RANGO	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
1	60	5.78333	0.312485	X
2	60	6.51667	0.312485	X
3	60	8.65	0.312485	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
1 - 2		*-0.733333		9.19716E-7
1 - 3		*-2.86667		9.19716E-7
2 - 3		*-2.13333		9.19716E-7

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

**Número de hojas al final de la aclimatización por rangos Tabla de gráfica F2.**

Multifactor ANOVA - HF

Prueba de rango múltiple para HF por RANGO

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD				
RANGO	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
3	39	3.26667	0.380621	X
1	56	3.96667	0.268342	X
2	60	5.25	0.258581	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
1 - 2		*-1.28333		7.75563E-7
1 - 3		*0.7		9.69214E-7
2 - 3		*1.98333		9.57652E-7

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

### Longitud total de las hojas al inicio de la aclimatización por rangos **Tabla de gráfica G1.**

Prueba de rango múltiple para LHI por RANGO

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD				
RANGO	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
1	60	1.68167	0.0818643	X
2	60	2.215	0.0818643	X
3	60	3.38167	0.0818643	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
1 - 2		*-0.533333		2.40946E-7
1 - 3		*-1.7		2.40946E-7
2 - 3		*-1.16667		2.40946E-7

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

### Longitud total de las hojas al final de la aclimatización por rangos **Tabla de gráfica G2.**

Multifactor ANOVA - LHF

Prueba de rango múltiple para LHF por RANGO

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD				
RANGO	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
1	56	1.65321	0.12673	X
2	60	2.13833	0.12212	X
3	39	2.81111	0.179755	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
1 - 2		*-0.485128		3.66274E-7
1 - 3		*-1.15791		4.57729E-7
2 - 3		*-0.672778		4.52269E-7

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

### Número de raíces al inicio de la aclimatización por rangos **Tabla de gráfica H1.**

Multifactor ANOVA - RI

Prueba de rango múltiple para RI por RANGO

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD				
RANGO	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
1	60	4.66667	0.385849	X
2	60	5.21667	0.385849	X
3	60	7.7	0.385849	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
1 - 2		*-0.55		0.00000113564
1 - 3		*-3.03333		0.00000113564
2 - 3		*-2.48333		0.00000113564

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

## Número raíces al final de la aclimatización por rangos **Tabla de gráfica H2.**

Multifactor ANOVA - RF

Prueba de rango múltiple para RF por RANGO

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD				
RANGO	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
1	56	4.69231	0.395268	X
3	39	4.86667	0.560654	X
2	60	6.01667	0.38089	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
1 - 2		*-1.32436		0.0000011424
1 - 3		*-0.174359		0.00000142765
2 - 3		*1.15		0.00000141062

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

## Longitud total de las raíces al inicio de la aclimatización por rangos **Tabla de gráfica I1.**

Multifactor ANOVA - LRI

Prueba de rango múltiple para LRI por RANGO

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD				
RANGO	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
1	60	1.36	0.113282	X
2	60	1.62	0.113282	X
3	60	2.44833	0.113282	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
1 - 2		*-0.26		3.33416E-7
1 - 3		*-1.08833		3.33416E-7
2 - 3		*-0.828333		3.33416E-7

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

## Longitud total de las raíces al final de la aclimatización por rangos **Tabla de gráfica I2.**

Multifactor ANOVA - LRF

Prueba de rango múltiple para LRF por RANGO

*Prosthechea vitellina*

---

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD

RANGO	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
1	56	1.38231	0.097681	X
2	60	1.7	0.0941278	X
3	39	1.86889	0.138552	X

---

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	*-0.317692	2.82317E-7
1 - 3	*-0.486581	3.5281E-7
2 - 3	*-0.168889	3.48601E-7

---

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

### Longitud total de las plantas al inicio de la aclimatización por rangos **Tabla de gráfica J1.**

Multifactor ANOVA - LTI

Prueba de rango múltiple para LTI por RANGO

---

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD

RANGO	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
1	60	2.08833	0.158677	X
2	60	3.28167	0.158677	X
3	60	5.525	0.158677	X

---

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	*-1.19333	4.67025E-7
1 - 3	*-3.43667	4.67025E-7
2 - 3	*-2.24333	4.67025E-7

---

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

### Longitud total de las plantas al final de la aclimatización por rangos **Tabla de gráfica J2.**

Multifactor ANOVA - LTF

Prueba de rango múltiple para LTF por RANGO

---

Método: 95.0 por ciento Tukey HSD

RANGO	Conteo	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
1	56	2.20128	0.206881	X
2	60	3.53833	0.199356	X
3	39	4.61056	0.293444	X

---

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	*-1.33705	5.97927E-7
1 - 3	*-2.40927	7.47225E-7
2 - 3	*-1.07222	7.38311E-7

---

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.