



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**GERMINACIÓN *IN VITRO* Y ADAPTACIÓN A
CONDICIONES *EX VITRO* DE *Laelia autumnalis* (La
Llave & Lexarza) Lindl. (ORCHIDACEAE.)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A

HUGO JESÚS SIERRA JIMÉNEZ

ÁREA: BIOLOGÍA VEGETAL

Director de Tesis: M en C. Amadeo Barba Álvarez

Unidad de Investigación en Biología Vegetal



MÉXICO, D.F.

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.

Dedicatorias

- ♥ A mi queridísima Familia que siempre ha estado a mi lado en todo momento, por su paciencia y apoyo durante este largo camino y, por supuesto, a la Fundación Sierra que me ha permitido llegar hasta donde estoy.
- ♥ A mis padres por darme la vida, por ser mi TODO, la fuente de inspiración, el motor de mi vida y el referente inmediato de lo que es el amor. A ti mami Leo por quererme tanto, por todo tu tiempo, tus sonrisas y apapachos. A ti papi Hugo, por enseñarme a costa de tu paciencia el significado de lo que representa la familia, nuestra familia. A los dos, por los jalones de orejas, que mal que bien me tienen hasta aquí y por todo lo que he aprendido de ustedes todos estos años... Ahhh y sobre todo por tener ese gran corazón para dar todo sin recibir nada a cambio. Son el ejemplo a seguir tanto mío como de mis hermanas, creo que nos sacamos la lotería con unos papás como ustedes...
- ♥ A mis hermanas por su cariño, por el tiempo que hemos compartido, por las alegrías, las risas, los momentos difíciles, las discusiones y sobre todo por mostrarme mis errores y defectos, sin ustedes, esta vida sería bastante aburrida, gracias por estar ahí. A Meli por ser un ejemplo de tenacidad, valentía y carácter. A mi Pk-Hayden por sus consejos, por pensar siempre en nosotros sus hermanos y por escucharme cuando la he necesitado. A mi pequeña Andy por nuestros juegos, bailes jeje, por sus bromas y por que es la alegría del hogar.
- ♥ También esto va para mis abuelos (q.e.p.d) que me echan un ojito desde allá arriba, mis abuelas que me quieren y que quiero tanto y a mis tías, tíos y primos. En particular para mis tías Silvia, Julieta y Yolanda, por ser como mis hermanas mayores en los primeros años de mi vida y por su cariño que me demuestran siempre.

Agradecimientos

Quiero dar un agradecimiento muy especial a mi Director de Tesis, el M. En C. Amadeo Barba Álvarez por su invaluable colaboración y apoyo incondicional durante la realización de este trabajo, dirigiéndolo y enriqueciéndolo de manera significativa. Por otra parte, también le agradezco su confianza, su paciencia.... finalmente aquí esta el fruto de un gran esfuerzo conjunto. Mil Gracias.

A la Dra. Alejandrina Ávila Ortiz, por su amistad incondicional y por todo lo aprendido durante mi estancia en el Herbario de la Facultad. Gran parte de sus enseñanzas fueron muy enriquecedoras y definitivas para mi formación como Biólogo. También le agradezco sus aportes en las revisiones a esta tesis.

A la M. en C. Susana Luna Rosales por sus valiosas aportaciones académicas dentro del laboratorio, la convivencia, la confianza, así como las observaciones realizadas a este trabajo. Gracias

A la Biól. Balbina Vázquez Benítez por sus comentarios que hizo al trabajo. Su lectura atenta y objetiva al borrador de esta tesis, me ayudó a enriquecerla y mejorarla. Gracias, que bueno que en la Facultad tengamos profesoras como usted.

Al Biól Juan Romero Arredondo, por despertar en mi, el interés en los temas de propagación y cultivo "*in vitro*" al tomar clase con usted en séptimo semestre. También quiero agradecerle los aportes realizados a este documento.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, mi segunda casa los últimos años. Dentro de esta Institución hay muchas personas que merecen ser mencionadas, en especial, los profesores que me acompañaron durante mi formación como profesionista, ellos son en orden cronológico: Raúl Zavala, Carlos Martínez, Mario Altamirano, Carmen Salgado, Dolores Escorza, Judith Villavicencio, Rosalva García, Salvador Hernández, Ramiro Ríos, Patricia Rivera y a mi "sensei" Germán Calva. También a la Jefatura de la Carrera de Biología integrada por la Biól. Maricela Arteaga Mejía, Biól. Joel Romero, Biól Rubén Zulbarán y a la Secretaria técnica Biól Irene.

Un agradecimiento especial a la Biól. Ma. de los Ángeles Galván Villanueva, de quien he recibido, apoyo, estímulo y orientación académica durante mi estancia en la Facultad, maestra, usted ha sido mi ángel de la guarda, la llevo en mi corazón. Gracias por todo.

A mis compañeros de la Unidad de Investigación en Biología Vegetal: Alondra, Erick, Lisbeth, Rosy y en especial a Rodrigo Romero Tirado, gracias amigo por tu amistad, por tantas vivencias recientes y por las observaciones a la tesis, etc etc etc. es un honor contar con personas como tú. MIL GRACIAS. Por supuesto, no podía faltar mi queridísima Susana Padrón Hernández, con quien compartí muchísimos buenos momentos de compañerismo y trabajo en laboratorio, MIL GRACIAS por todo!

A mis compañeros de la generación : Ana Victoria, Claudia, Gisela, Julia, Leonardo, Luis Antonio, Nancy, Saúl, Sinaí y Víctor Manuel. Gracias a todos ustedes, creo que son la parte medular de mi vida académica, fuimos parte de una pequeña gran tribu en esta

megadiversa comunidad zaragozana por varios semestres y a todos y cada uno de ustedes los quiero con todo mi hipotálamo.

No podía quedar fuera mi segunda familia. Gracias Adolfo, Edgar, Jesús, Mauricio y Roberto, mis hermanos, que aunque no de sangre, siempre me han tendido la mano en los momentos mas difíciles, no saben en verdad cuanto les agradezco todo lo que han hecho por mi, no encuentro las palabras para expresarles mi sentir, solo que siempre estaré junto a ustedes en las malas, en las buenas y en las peores... Juntos hasta el final.....

Gracias también a Tanita Chula, el eje de mi vida durante mucho tiempo, parte fundamental de mi desarrollo profesional, compañera de mil batallas, aquí esta el fruto de todo el apoyo que recibí de ti, siempre estuviste al pendiente de mi vida y te lo agradezco infinitamente, este trabajo también es tuyo.

A mis amigos, Adán, Aminta, Alma Iris, Bety López, Bety Ricardo, Fernando, Raúl, Rebe, Rogelio, gracias por compartir tantas experiencias juntos y sobre todo gracias por su amistad.

A la DGDC y en particular al Museo de la Luz, a Isaías Hernández, Leticia Enríquez, Guadalupe Saucedo, Yonadxandi Manríquez y a mi nueva jefa Mariana Correa, por permitirme participar en esta experiencia tan fantástica de divulgar la ciencia. Gracias por su amistad, su comprensión y sus atenciones para conmigo. También les agradezco a mis compañeros anfitriones Alfonso, Cristina, Dulce, Fausto, Heriberto, Irene, Israel, Iván, Juanita, Liliana, Marcia, Memo, Rocío, Violeta, Viridiana, Yajaira, Yesenia por encontrar en ellos un universo infinito de ideas, mis respetos y admiración para todos ustedes, soy su fan #1. Agradezco de manera especial a Lola, Rebeca y Yazmín, por ser mis “gurús”, gracias por su amistad y sus consejos, en ustedes encontré un gran apoyo. Las quiero mucho.

A mi diseñadora gráfica de cabecera Gricel Picazo por la elaboración del diseño y mapas contenidas en este trabajo.

A mis amigos Emar, Fer, Gaby, Hugo, Rubén y Tony. Gracias por su amistad, su apoyo y sus consejos.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MARCO TEÓRICO	4
GENERALIDADES	4
PROPAGACIÓN DE ORQUÍDEAS.....	9
GERMINACIÓN DE SEMILLAS EN LA NATURALEZA	9
GERMINACION <i>IN VITRO</i>	10
GERMINACIÓN SIMBIÓTICA Y ASIMBIÓTICA	10
FACTORES QUE AFECTAN LA GERMINACION <i>IN VITRO</i>	11
PAPEL DE LA LUZ EN LAS PLANTAS	12
RECEPCIÓN DE RADIACIONES EN LAS PLANTAS.....	13
<i>REFLEXIÓN</i>	14
<i>ABSORCIÓN</i>	14
<i>TRANSMISIÓN</i>	14
EL PAPEL DE LA LUZ EN LA GERMINACIÓN.....	14
<i>LUZ ARTIFICIAL</i>	16
<i>CALIDAD E INTENSIDAD DE LA LUZ</i>	16
PLANTAS PROPAGADAS <i>IN VITRO</i>.....	17
ACLIMATIZACIÓN	17
PROCEDIMIENTO DE ACLIMATIZACIÓN DE PLANTULAS OBTENIDAS <i>IN VITRO</i>	19
SUSTRATOS PARA EL CULTIVO DE PLANTAS	19
CARACTERÍSTICAS DE ALGUNOS SUSTRATOS.....	20
<i>AGROLITA</i>	20
<i>CARBON ACTIVADO</i>	21
<i>ESFAGNUM</i>	21
<i>TEZONTLE</i>	21
FUENTES DE NUTRIENTES PARA LAS PLANTAS	21
ABONOS ORGÁNICOS.....	22
FERTILIZANTES.....	22
<i>LOS ABONOS INORGÁNICOS O FERTILIZANTES QUÍMICOS</i>	22
<i>PRESENTACIÓN FÍSICA</i>	22
<i>VENTAJAS DEL USO DE FERTILIZANTES</i>	23
<i>DESVENTAJAS DEL USO DE FERTILIZANTES</i>	23

Hugo Jesús Sierra Jiménez

FERTILIZACIÓN DE ORQUÍDEAS	23
FACTORES QUE AFECTAN LA ABSORCIÓN DE NUTRIMENTOS EN ORQUÍDEAS	25
ALTERACIONES NUTRICIONALES EN ORQUÍDEAS	25
NITRÓGENO	25
FÓSFORO	26
POTASIO	26
CARACTERÍSTICAS DE LOS MÉTODOS DE FERTILIZACIÓN	26
FERTILIZACIÓN POR ABSORCIÓN FOLIAR	26
FERTILIZANTES DE DISPONIBILIDAD CONTROLADA	27
FERTILIZANTES GRANULARES	27
<i>Laelia autumnalis</i> (La Llave & Lexarza) Lindley Orchidaceae	28
DESCRIPCIÓN	28
DISTRIBUCIÓN	30
EPOCA DE FLORACION	31
JUSTIFICACIÓN	32
HIPÓTESIS	33
GENERAL	33
PARTICULARES	33
OBJETIVOS	34
GENERAL	34
PARTICULARES	34
MATERIALES Y METODOS	35
CULTIVO IN VITRO	35
MATERIAL BIOLÓGICO	35
DESINFESTACION DE LAS SEMILLAS	35
SIEMBRA IN VITRO DE LAS SEMILLAS	35
CONDICIONES DE INCUBACIÓN	35
PRUEBAS POSTERIORES	36
ACLIMATIZACIÓN DE LAS PLANTAS A CONDICIONES EX VITRO	38
FERTILIZACION DE PLANTAS	40
RESULTADOS	42
ONTOGÉNIA DE <i>Laelia autumnalis</i>	42
EFFECTO DE LA LUZ FILTRADA EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE <i>Laelia autumnalis</i>	45

Hugo Jesús Sierra Jiménez

EFFECTO DEL ESTÍMULO LUMÍNICO EN LA PIGMENTACIÓN FOLIAR DE PLÁNTULAS <i>IN VITRO</i>	53
COMPOSICIÓN PIGMENTARIA DE LAS HOJAS DE <i>Laelia autumnalis</i>	55
BIOMASA DE LAS PLANTAS OBTENIDAS <i>IN VITRO</i>	59
EFFECTO DE LA MEZCLA DE SUSTRATOS EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO <i>EX VITRO</i>	63
ÍNDICE DE SUPERVIVENCIA (IS) DE LAS PLÁNTULAS EN LOS SUSTRATOS	63
DIFERENCIAS ENTRE LAS MEZCLAS DE SUSTRATOS A LOS 45 DÍAS	64
DIFERENCIAS ENTRE LAS MEZCLAS DE SUSTRATOS A LOS 90 DÍAS	65
EFFECTO DE LOS FERTILIZANTES EN EL DESARROLLO <i>EX VITRO</i>	68
DIFERENCIAS ENTRE LOS TIPOS DE FERTILIZANTES A LOS 30 DÍAS	68
DIFERENCIAS ENTRE LAS MEZCLAS DE SUSTRATOS A LOS 60 DÍAS	70
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	72
EFFECTO DE LA LUZ FILTRADA EN EL CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE LA ORQUÍDEA <i>Laelia autumnalis</i>	72
EFFECTO DE LA CALIDAD DE LA LUZ EN LA PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS Y BIOMASA	74
EFFECTO DE LA MEZCLA DE SUSTRATOS EN LA ACLIMATIZACIÓN Y EN EL DESARROLLO <i>EX VITRO</i>	77
EFFECTO DEL MÉTODO DE APLICACIÓN Y TIPO DE FERTILIZANTE EN EL CRECIMIENTO	79
CONCLUSIONES	80
RECOMENDACIONES	82
BIBLIOGRAFÍA	83
ANEXO I	90
ANEXO II	93

RESUMEN

Laelia autumnalis es una orquídea epífita endémica del centro de México que ha sido poco estudiada en relación a su biología básica y en particular al proceso de germinación, la cual se puede estudiar bajo condiciones controladas “*in vitro*”, en este sistema existen diversos factores que influyen en la germinación en gran medida como son la composición del medio de cultivo (minerales, azúcares, mezclas orgánicas complejas, pH, la temperatura, la luz etc.). En etapa de aclimatización y establecimiento *ex vitro* de las plantas obtenidas, otros factores que intervienen son el tipo de sustrato utilizado y la fertilización.

En este trabajo se estudiaron los procesos de la germinación asimbiótica “*in vitro*” con diferente calidad de luz, así como el crecimiento y desarrollo *ex vitro* de las plantas generadas.

Las variaciones de la calidad de la luz experimentales fueron obtenidas mediante filtración de luz con seis filtros durante el cultivo *in vitro*. Se determinó su efecto mediante las diferencias morfológicas, de desarrollo, de pigmentos y biomasa. En la etapa *ex vitro* se evaluó el efecto de seis mezclas de sustratos y la acción de tres tipos de fertilizantes y siete formas de aplicación.

Finalmente se eligieron las condiciones de mejor y más rápido desarrollo *in vitro* y el método de establecimiento *ex vitro* más adecuado.

INTRODUCCION

La familia de las orquídeas es una de las más diversas morfológicamente y con el mayor número de especies, ya que se estima que cuenta con alrededor de 25 000 especies (Dressler, 1990). La flora orquideológica de México comprende 1 106 especies y subespecies descritas, distribuidas en 159 géneros. Una de sus características más sobresalientes es la alta proporción de especies endémicas, ya que se han registrado 444 especies o subespecies endémicas que corresponden aproximadamente a 40% del total de taxa registrados en el país (Soto-Arenas, 1996).

En México, todas las regiones situadas al sur del Trópico de Cáncer, desde las costas del Pacífico y las del Golfo hasta las regiones que rebasan los 3 500 m sobre el nivel del mar en los estados de Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Veracruz y Chiapas albergan la mayor riqueza de orquídeas, otros estados con una cifra respetable de especies son: Morelos, México, Michoacán y las regiones mas bajas de Puebla y San Luis Potosí (Wright, 1958). Aunque el número de especies mexicanas de orquídeas es menor que el de otros países de América tropical (Colombia, Ecuador, Perú, Brasil, etc.), México cuenta con un conocimiento taxonómico más avanzado de sus especies.

Entre las plantas vasculares, la familia Orchidaceae ha sido una de las más vulnerables por la destrucción y transformación de su hábitat, por la extracción masiva de plantas de las poblaciones silvestres, dado su alto valor hortícola y comercial, y por las características ecológicas que presentan las especies, como sus bajas tasas de crecimiento, ciclos de vida relativamente largos y el escaso reclutamiento de nuevos individuos en condiciones naturales. *Laelia autumnalis* es una de las orquídeas más apreciadas ornamentalmente, tanto en Michoacán como en gran parte de la Republica Mexicana, lo cual ha propiciado una intensa explotación de la misma, lo que ocurre también en otras especies, principalmente en la época de floración (García y Ávila, 1989)

Aunque una sola cápsula puede contener desde tres mil y hasta tres millones de semillas, la mayor parte de ellas no llegan a germinar porque es difícil que caigan en lugares con condiciones bióticas y abióticas favorables (luz, humedad y materias nutritivas). Es por esto que de entre muchos factores internos y externos que afectan la germinación y el crecimiento de las plántulas, la luz sea considerada como uno de los factores más importantes. La calidad y la intensidad de la luz afectan la germinación, el crecimiento y la diferenciación. De ahí que, el control de la morfogénesis, por medio de la calidad de la luz durante la micropropagación, sea un área importante de investigación.

De la misma forma, las actividades fisiológicas de las plantas producidas *in vitro*, son diferentes a las que crecieron autotróficamente, estos cambios implican el débil desarrollo del aparato fotosintético lo que puede ser un factor importante para que al momento del trasplante sean vulnerables a cualquier deficiencia en el ambiente

Hugo Jesús Sierra Jiménez

afectando su desarrollo y crecimiento (Pierik, 1990; Lewandowski, 1991), para lo cual el empleo de sustratos y el aporte de nutrientes de manera adecuada permite un incremento en el establecimiento de las plántulas en condiciones *ex vitro*.

Por todo lo anterior, deben tomarse en cuenta medidas conservacionistas de orquídeas silvestres y establecer algunas técnicas de propagación que permita a recuperar poblaciones amenazadas por factores humanos o ambientales (Lapiner, 1973).

MARCO TEÓRICO

GENERALIDADES

Las orquídeas han sido uno de las plantas más admiradas y apreciadas desde hace muchos siglos por diferentes civilizaciones. Se sabe que los chinos, tiempo antes de Cristo cultivaron algunas especies del género *Cymbidium*; también los griegos las conocían pues fue Teofrasto, discípulo de Aristóteles, quien les dio el nombre de Orquídeas (orchis=testículo) debido a la forma de sus pseudobulbos (Ávila, 1998).

Pertenecientes a la familia Orchidaceae, este grupo tiene un amplio rango de distribución. Se localiza prácticamente en los cinco continentes, con excepción de los polos y las regiones desérticas (Caneva, 1978). De acuerdo a la distribución, las orquídeas se agrupan en dos categorías: tropicales y templadas. Los países tropicales e intertropicales son los que poseen cientos de géneros de orquídeas que en su mayoría son epifitas. Al alejarse del trópico se encuentran menos plantas de este tipo y en cambio, abundan las terrestres que prefieren en su gran mayoría, las zonas templado-frescas o frías (Abraham y Vatsala, 1981). De acuerdo a su forma de vida podemos agruparlas en epífitas (aquellas especies que viven sobre otras plantas) (Fig. 1), terrestres (que viven como la mayoría de las demás plantas, en tierra) (Fig. 2) y litófitas o rupícolas (que viven sobre rocas) (Fig. 3) (Ávila, 1998).

La mayoría de las orquídeas mexicanas se localizan, generalmente, al sur del trópico de Cáncer, los estados con mayor concentración de orquídeas en México (Fig. 4) son Puebla, Morelos, Michoacán, San Luis Potosí, Veracruz Oaxaca, Guerrero, Chiapas, Estado de México (Lapiner, 1973). En estos sitios, las orquídeas son conocidas con nombres populares que aluden ya sea a la época en que florecen, a festividades religiosas o bien a la forma que asemeja la flor, por ejemplo “torito”, “calaverita”, “flor de mayo”, “flor de Candelaria”, “flor de muerto”, entre otros. Sin duda las flores más admiradas son las del género *Laelia* muy conocidas por su uso tradicional en las ofrendas de muertos y en fiestas como el día de las madres o el de la Virgen de Guadalupe. (Ramírez, 1996)

Debido a la belleza y a los altos precios que alcanzan las orquídeas actualmente, son motivo de cultivo a nivel particular e industrial para su comercialización como plantas ornamentales y para la venta de flor cortada, lo que tiene una gran importancia económica a nivel mundial. En México también figuran entre las plantas ornamentales más apreciadas y se reporta el uso de diversas especies como medicinales, para la extracción de gomas y mucilagos, para hacer adhesivos, aglutinantes, como condimento y aromatizante, entre otros. (Ávila, 1998)



Figura. 1. Orquídea de hábito epífita



Figura. 2. Orquídea de hábito terrestre



Figura. 3. Orquídea de hábito litófito

Varios son los aspectos de estas plantas que llaman tanto la atención; mientras unas alcanzan hasta 30 metros de longitud, otras miden apenas unos cuantos milímetros (Fig. 5). Las flores se agrupan casi siempre en racimos de 2 a 20 y pueden ser blancas, rosadas, lilas, rojas, amarillas, verdes y raramente azules. (Ramírez, 1996)

Sus raíces pueden ser aéreas o subterráneas. Las aéreas son adaptaciones a las condiciones ambientales epifíticas. En estas raíces los pelillos

Hugo Jesús Sierra Jiménez

radicales se han sustituido por una funda de células muertas y esponjosas llamada velamen, característica de orquídeas epífitas, y presente en algunas terrestres y litofíticas. El velamen facilita la absorción de agua y minerales; además, las raíces pueden ser fotosintéticas, lo cual explica la coloración verdosa de sus puntas (Fig. 6). Estas 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. En general, son gruesas, cilíndricas o aplanadas. (Barba, A. *et. al.* 2002)



Figura. 5. Diferencias de tamaños de orquídeas.



Figura. 6. Raíz fotosintética de orquídea epífita mostrando velamen



Figura 4. Estados de la República Mexicana donde se presenta el mayor número de especies de orquídeas.

La principal característica de las orquídeas (Fig. 7 y 8) es la flor, cuya morfología la hace muy diferente al resto de las flores. La mayoría de las modificaciones morfológicas son el resultado de millones de años de evolución, durante la cual, las flores de orquídea se han adaptado a través de la selección natural a sus polinizadores. Las flores consisten de tres sépalos y tres pétalos, alguno o todos pueden estar modificados en gran medida. Por lo general, uno de los pétalos difiere en apariencia de los otros dos y es denominado labio o labelo, opuesto a la estructura reproductiva llamada columna o gimnostemo (Fig. 8). Los órganos reproductivos, el masculino o polinia y el femenino o superficie estigmática, contenidos en la columna, están compuestos de una estructura conformada por la fusión del androceo y de una parte del gineceo (Williams, 1982). Las polinias son en realidad pequeños sacos que contienen miles de granos de polen; poseen una superficie pegajosa que se adhiere al insecto facilitando su transporte hasta otra flor donde se producirá la fecundación (Arditti, *et al*, 1982).

Las variaciones estructurales de las flores facilitan la polinización por una determinada especie de insecto, pájaro, ó murciélago. Una vez realizada la fecundación, se forma una cápsula que contiene miles de diminutas semillas. Una sola cápsula o fruto de orquídea puede contener hasta 3,000,000 semillas, la mayoría de las cuales no se convierten en plantas (Lapiner, 1973).

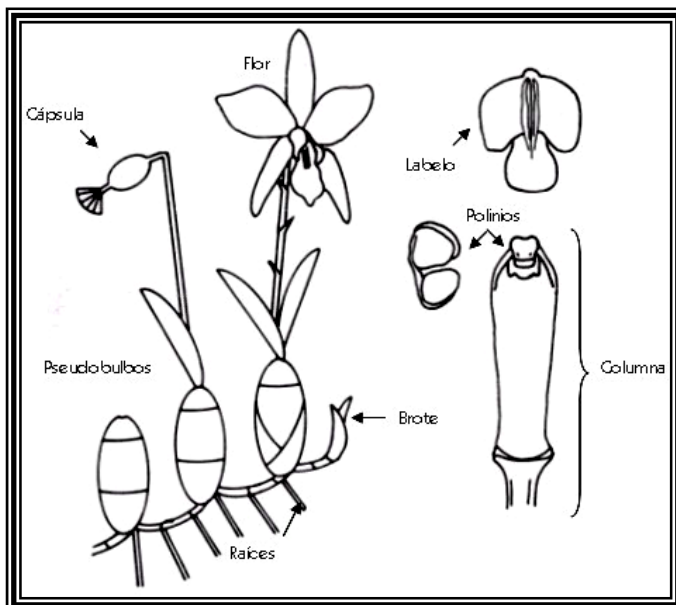


Figura 7. Diagrama esquemático de una planta de orquídea.

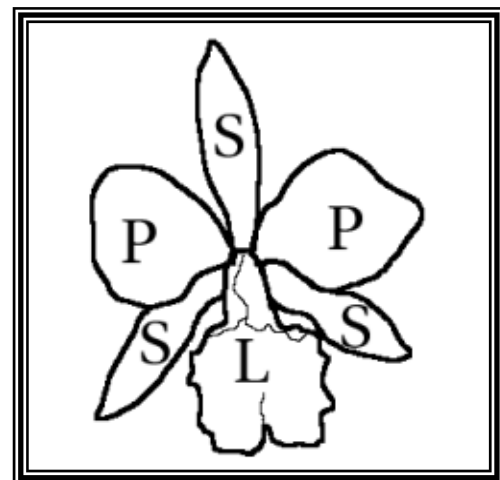


Figura 8. Diagrama esquemático de los verticilos florales de orquídea. sépalos (S), pétalos (P), labelo (L)

El tallo, dependiendo de su crecimiento, puede clasificarse en monopodial y simpodial. Las orquídeas monopodiales presentan un eje único, cuyo punto de crecimiento está en el ápice superior. Por otro lado, 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 más o menos erectos denominados pseudobulbos (Barba, *et al.*, 1995). Estos rizomas y pseudobulbos son estructuras que pueden ser utilizadas para la propagación asexual, o bien las semillas como medio de propagación sexual.

PROPAGACIÓN DE ORQUIDEAS

Actualmente existen varios métodos para propagar orquídeas. La propagación asexual es una serie de técnicas empleadas para la multiplicación a partir de partes vegetativas. Se utilizan tejidos vegetales que conserven la potencialidad de multiplicación y diferenciación celular para generar nuevos tallos y raíces a partir de cúmulos celulares presentes en diversos órganos.

Este tipo de propagación tiene esencialmente tres variantes, que son: 1) la propagación a partir de pseudobulbos, rizomas, estolones etc., de las plantas que conserven la potencialidad de enraizar; 2) la propagación por injertos de segmentos de la planta sobre tallos de plantas receptoras más resistentes, y 3) la micropropagación a partir de tejidos vegetales en cultivo *in vitro*. La propagación de plantas también se lleva a cabo a partir de la germinación de semillas (Vázquez, *et al.* 1997).

GERMINACIÓN SIMBIOTICA DE SEMILLAS EN LA NATURALEZA

Las semillas de orquídeas son diminutas, miden de 0.25 a 1.2 mm de largo y de 0.09 a 0.27 mm de ancho y pesan poco menos de una millonésima de gramo. Consisten generalmente de un embrión indiferenciado y simple, el cual está formado por un número limitado de células, por lo general sin endospermo y cubierto por una testa (Fig. 9) (Arditti, 1967).

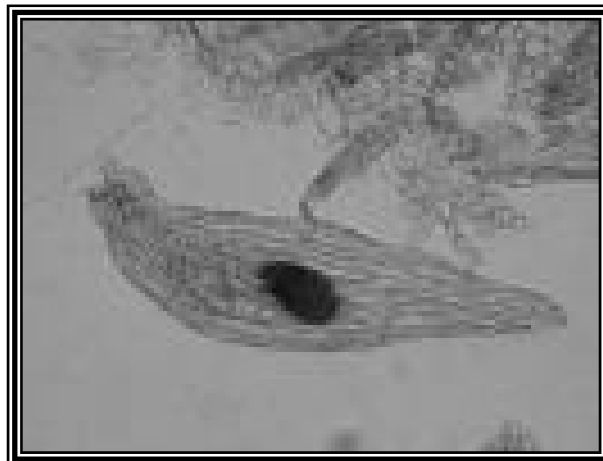


Figura. 9. Semilla de orquídea exhibiendo al embrión y la testa.

Generalmente estas semillas no germinan en el medio natural a menos que sean infectadas por un hongo micorrízico, el mismo que abastece a las plantas jóvenes con azúcares y nutrientes que necesitan hasta que sean lo suficientemente grandes para fabricar su propio alimento. Cuando la semilla germina produce una masa indiferenciada de células llamada protocormo. Manteniendo las condiciones normales, el protocormo continuará su crecimiento por varias semanas, meses o incluso años dependiendo de la especie hasta que alcance la edad apropiada para producir raíces y hojas. En el caso de orquídeas terrestres, es de vital importancia que la relación orquídea-hongo se conserve durante los estados tempranos del ciclo de vida de la planta ya que el protocormo enterrado no puede fabricar alimento por sí mismo. Por otro lado, los protocormos de las orquídeas epífitas son comúnmente verdes, lo que les posibilita producir parte de su alimento (McKendrick, 2000).

GERMINACION *IN VITRO*

El proceso de germinación, aunque con algunas diferencias, es similar entre la mayoría de las orquídeas (Arditti, 1992). Este proceso inicia con la absorción de agua por el embrión, posteriormente esta estructura se hincha y ensancha, sus células se alargan, se vacuolan por lo que el embrión asume una forma esférica (etapa de esférula pequeña), después estas células hacen presión constante con la testa hasta romperla. Las células del embrión inician con síntesis de clorofila, utilizan el material alimenticio almacenado de la semilla, y una vez iniciado el crecimiento, continúa con la absorción de la materia orgánica del sustrato y comienza la diferenciación de los órganos, son desarrollados pelos absorbentes a partir de la epidermis y a su vez se desarrolla una pequeña papila hacia la base (Shushan, 1959). Conforme esta estructura aumenta en tamaño se forma una masa globular de células (protocormo) con una depresión en su superficie superior. El primordio foliar emerge a partir de esta depresión conforme el protocormo continúa su desarrollo. Una segunda y una tercera hoja se forman precedidas por el desarrollo de la raíz, se forma clorofila en las hojas o en otros órganos. El tiempo requerido para cada uno de estos eventos varía de acuerdo a las especies (Arditti, *et al.*, 1982; Baker *et al.*, 1987).

GERMINACIÓN SIMBIÓTICA Y ASIMBIÓTICA

Mediante la germinación *in vitro* bajo condiciones asépticas, se introducen semillas en frascos de vidrio o plástico sobre un medio de agar nutritivo que contiene los azúcares y minerales necesarios para que las semillas germinen y crezcan. Hay dos tipos básicos de germinación *in vitro*: simbiótica y asimbiótica (McKendrick, 2000).

En la germinación simbiótica, las semillas se siembran con una pequeña fracción del hongo micorrízico apropiado. El hongo crece en el medio, coloniza a las semillas en proceso de germinación y se origina una relación simbiótica que se espera alimente al protocormo hasta que éste genere hojas y se convierta

autótrofa. Sin embargo, la desventaja es que se necesita seleccionar, aislar y reproducir el tipo de hongo micorrízico adecuado para que se origine la simbiosis y prevenir la muerte de las semillas (McKendrick, 2000).

La germinación asimbiótica es generalmente usada en la propagación de orquídeas tropicales, las mismas que tienden a crecer fácilmente en comparación con sus parientes en zonas templadas. El medio usado para la germinación asimbiótica es más complejo que para la germinación simbiótica, ya que todos los nutrientes orgánicos e inorgánicos y los azúcares deben estar disponibles para el embrión en una forma apropiada puesto que ya no existe la intermediación del hongo (McKendrick, 2000).

Knudson (1922), estableció un método completamente controlado, estandarizado y simple para la germinación de semillas de orquídea. Él había realizado trabajos anteriores que mostraron que los azúcares tenían una influencia favorable sobre el crecimiento de las plantas, por lo que dedujo que la semilla de orquídea podría requerir la presencia de algún azúcar para germinar.

Knudson encontró que la semilla germinaba fácilmente sin la presencia del hongo cuando era sembrada sobre agar al cual se le había agregado minerales y carbohidratos. Este método fue llamado asimbiótico.

Davis (1946) citado en Anderson 1967, hace referencia de Davis, que en 1946 señaló que era necesario mantener la semilla de orquídea sin microorganismos, deshidratada y en refrigeración si iba a ser almacenada durante algún tiempo. Recomendó colocar la cápsula en un sobre de papel justo antes de madurar. Esta medida aseguró que ninguna semilla se perdería y también imposibilitaría a los microorganismos entrar a la cápsula. Posteriormente las semillas deberían ser extraídas del fruto. Con respecto a la desinfección en la misma referencia, Liddell en 1947, reportó resultados favorables al usar hipoclorito de sodio ("Clorox") como un agente desinfectante de semillas. El "Clorox" ha sido usado satisfactoriamente en *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium* y *Vanda*. El empleo de Clorox es mas ventajoso que el hipoclorito de calcio.

FACTORES QUE AFECTAN LA GERMINACION *IN VITRO*

En la germinación asimbiótica *in vitro* existen diversos factores que influyen dicho proceso (aunque el crecimiento y desarrollo dependen en gran medida de cada especie). Dentro de estos factores están; la composición del medio de cultivo (minerales, azúcares, pH, vitaminas, reguladores hormonales, mezclas orgánicas complejas, etc.), la temperatura y la luz.

Northen en 1950 (citado en Anderson, 1967) publicó fórmulas nutritivas para el cultivo *in vitro* que contenían endospermo de coco y jugo de tomate, los cuales tuvieron beneficios en el crecimiento de muchos géneros de orquídeas. Hager en 1954 (citado en Anderson, 1967), señaló la importancia de la nutrición,

temperaturas elevadas, y fotoperíodo con 14 a 16 horas de luz intensa para promover el crecimiento de plantas de *Cattleya*. Por su parte Kotomori y Murashige en 1965 (citado en Anderson, 1967), estudiaron los efectos del endospermo líquido de coco sobre plantas de *Dendrobium*, estableciendo que esta tenía un efecto inhibitorio en la germinación, pero estimulador en plantas de un año. El endospermo líquido de coco contenía giberelinas, las que inhibieron el desarrollo de la raíz y la formación de brotes. No hubo ningún efecto promotor sobre la tasa de germinación, sólo en el crecimiento subsiguiente. La giberelina fue responsable del efecto de estimulación sobre las plantas de un año.

Semillas de algunos géneros han sido germinadas en medios nutritivos como el Knudson C y Stenitz (Baker, *et al*, 1987). *Encyclia botaina*, *Ponthieva sp* y *Cattleya sp* han podido cultivarse asimbióticamente, siendo el más efectivo para estas especies el medio Knudson C (Stenberg, y Kane, 1998). *Bletia urbana* fue exitosamente germinada en el medio Knudson C adicionado con azúcar y endospermo líquido de coco (Rubluo, *et al*, 1989).

Otro medio de cultivo, reportado para la germinación de orquídeas, es el de Murashige y Skoog, en el cual han prosperado eficientemente orquídeas como *Cypripedium acaule* (St-Arnaud, *et al*, 1992).

Aún cuando muchos factores pueden influir en la micropropagación, los factores físicos juegan un papel determinante. En este sentido (Villalobos y Thorpe, 1991), señalan que la luz y la temperatura han sido los factores físicos considerados más importante en la micropropagación.

PAPEL DE LA LUZ EN LAS PLANTAS

Las radiaciones actúan sobre las plantas como fuente energética para reacciones fotoquímicas y como estímulo del crecimiento. Los distintos efectos de las radiaciones se manifiestan a través de la captación de cuantos, cuya energía depende de la longitud de onda (Larcher, 1977).

Al analizar el espectro de la luz solar, se pueden distinguir tres porciones, que de acuerdo a sus longitudes de onda larga, media y corta (Fig 10), se denominan luz infrarroja, visible y ultravioleta, respectivamente (Molles, 1999).

La luz infrarroja es muy importante para la regulación de la temperatura de las plantas. Sin embargo, no contiene suficiente energía para promover la fotosíntesis. En el otro extremo del espectro solar, la luz ultravioleta porta tanta energía que rompe los enlaces covalentes de muchas moléculas orgánicas y puede destruir la compleja maquinaria bioquímica de la fotosíntesis. Entre estos extremos energéticos está la luz que podemos ver, la luz visible, también llamada radiación fotosintéticamente activa o PAR (por sus siglas en inglés). Esta comprende longitudes de onda entre los 400 y 700 nm y transporta la energía necesaria para las reacciones dependientes de luz de la fotosíntesis, sin interferir

en la estabilidad de las moléculas orgánicas. La PAR corresponde al 45% del contenido de energía total del espectro solar a nivel del mar, en tanto que la luz infrarroja el 53%. El resto corresponde a luz ultravioleta (Molles, 1999).

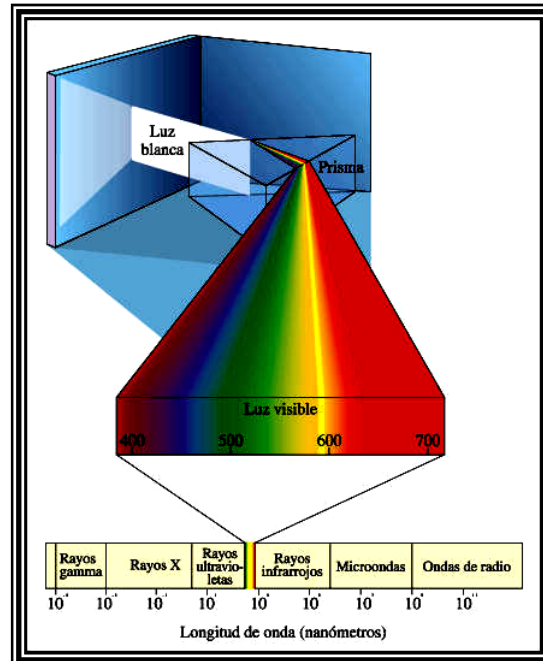


Figura. 10. Espectro Electromagnético: Refracción de la luz visible

RECEPCIÓN DE RADIACIONES EN LAS PLANTAS

Una parte de la radiación lumínica que llega a una hoja queda reflejada por la superficie, otra es absorbida y puede tener efectos fisiológicos y el resto de la radiación es transmitida (Figura 11). Reflexión, absorción y transmisión de las radiaciones actúan selectivamente en dependencia con la longitud de onda (Larcher, 1977).

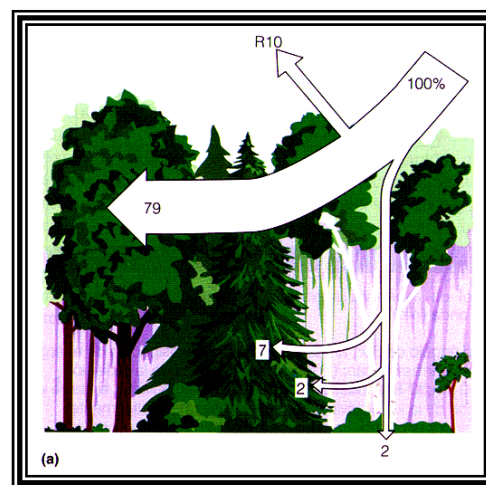


Fig. 11. Porcentaje de absorción y reflexión de los rayos luminosos

REFLEXIÓN

De una radiación perpendicular incidente, las hojas reflejan un 70 % en la zona infrarroja, mientras que en la zona del PAR sólo entre 6-12 % por término medio. La luz verde es la reflejada con mayor intensidad (10-20 %), mientras que la roja o naranja lo es con la menor (3-10 %). Por lo general la radiación ultravioleta es muy poco rechazada, ya que las hojas no reflejan en el UV más del 3 % (Larcher, 1977).

ABSORCIÓN

La radiación que penetra en la hoja es ampliamente absorbida. La mayor parte de la UV queda retenida en la epidermis, de modo que a las capas inferiores llega normalmente del 2 al 5 % de la radiación UV. Por tanto, la epidermis actúa con respecto al parénquima asimilador como un filtro efectivo de la radiación UV. La absorción de la PAR viene condicionada por los pigmentos del cloroplasto. Por ello, los máximos del espectro de absorción de las hojas coinciden con el máximo de absorción de la clorofila y los carotenoides. Alrededor del 70% de la radiación fotosintéticamente útil que penetra hasta el mesófilo queda absorbida por la clorofila (Larcher, 1977).

TRANSMISIÓN

La permeabilidad de las hojas frente a las radiaciones depende de su estructura y grosor. Las hojas mesómorfas permiten el paso de un 10 a un 20 % de la radiación normal, las hojas muy delgadas hasta un 40 % y las gruesas y recias pueden impedir completamente su paso (Larcher, 1977), por lo tanto las hojas funcionan como filtros de luz.

EL PAPEL DE LA LUZ EN LA GERMINACION

Existe una gran variedad de respuestas en la germinación con respecto a la luz. Entre las plantas cultivadas se ha visto que no requieren luz para germinar, pues lo hacen de igual manera en la luz que en la oscuridad. En cambio, muchas semillas silvestres tienen comportamientos diferenciales con respecto a la luz. Existen aquellas que sólo germinan en la oscuridad, aquellas que sólo germinan bajo luz continua, otras que requieren de un periodo breve de iluminación para germinar y otras más que son indiferentes a la presencia de luz u oscuridad. Al igual que en el caso de las temperaturas alternantes, las semillas encuentran en la naturaleza ambientes lumínicos muy diversos: bajo la vegetación, en un hueco, bajo la hojarasca, bajo tierra, etcétera (Moreno, 1996).

Ecológicamente la luz es un factor de gran importancia. Determina la posición en el suelo donde va a germinar una semilla; controla la germinación bajo el dosel de las ramas de los árboles, y al interactuar con la temperatura participa en el control estacional del rompimiento de la latencia. Algunas semillas sólo

requieren luz para germinar cuando están recién colectadas, mientras que en otras este efecto persiste hasta por un año y en otras más, se desarrolla durante el almacenamiento. Por lo tanto, es un factor en el cual la edad de la semilla también es determinante (Moreno, 1996).

La sensibilidad de las semillas de muchas especies a la luz, aumenta en relación con el tiempo de imbibición. El almacenaje de semillas bajo condiciones de humedad relativa alta es suficiente para hacerlas sensibles a la luz (Moreno, 1996).

Las primeras investigaciones que analizaron con detalle el efecto de la luz en la germinación se llevaron a cabo con semillas de lechuga. Demostraron que dentro del espectro de luz había tres regiones que afectaban la germinación y la latencia: a) el azul, alrededor de los 450 nm, b) el rojo, alrededor de los 650 nm y c) el rojo lejano, alrededor de los 750 nm. Se encontró que la luz roja rompe la latencia y promueve la germinación, mientras que la luz azul y la roja lejana inhiben la germinación. También se encontró que la alternancia de iluminaciones provoca una reversión de la estimulación y la inhibición de la germinación. La germinación de las semillas de lechuga es estimulada por la luz roja pero puede inhibirse si posteriormente se iluminan con luz infrarroja. Si más tarde se iluminan con luz roja se vuelve a inducir la germinación. La luz roja estimula la germinación y la luz infrarroja la inhibe. Se puede repetir esta alternancia y obtener esta respuesta numerosas veces. La naturaleza de la última iluminación será la que determine la respuesta germinativa (Moreno, 1996).

Igual que en otros muchos fenómenos en los que interviene la luz, el efecto depende tanto de la intensidad como de la duración de la iluminación. La respuesta germinativa —estimulación e inhibición— estará en función tanto de la intensidad de la luz como de su duración, o sea de la energía total de irradiación (Moreno, 1996).

En términos generales las orquídeas pueden ser separadas en plantas de “sol y de sombra” de acuerdo a las condiciones donde mejor se desarrollan. *Phalaenopsis* y *Paphiopedilum* son plantas de sombra que se desarrollan óptimamente a intensidades de luz de 7,560 a 8,100 lux, saturando las hojas, mientras que *Cattleya* o *Cymbidium* son plantas de sol que requieren alrededor de 10,800 lux para producir la saturación de sus hojas. Las especies del género *Cattleya* puede crecer bien con luz solar directa (129,600-162,000 lux) si es eficiente la termorregulación de las hojas. Cuando las condiciones de crecimiento son pobres con intensidades bajas de luz, el crecimiento de nuevos brotes se inhibe completamente, pero, en altas intensidades de luz, el crecimiento de flores y brotes se induce (Whitner, 1964).

LUZ ARTIFICIAL

El uso de luz fluorescente de lámparas de ancho espectro lumínico es conveniente en el cultivo de semillas de orquídea, ya que incrementa la germinación y la tasa de supervivencia en cultivo. Al evaluar el efecto de diferentes lámparas fluorescentes los resultados no son iguales, ya que las fuentes de luz son diferentes. Las plantas crecen mejor bajo lámparas “Wide-Spectrum Gro Lux” y “Gro Lux standard”, que en otras fuentes de luz artificial (“Cool White” y “Warm White”). No hay diferencias en la pigmentación de la planta al usar estas lámparas (Halpin y Farrar, 1965).

En otro estudio, Seibert, *et al.*, (1975) evaluaron los efectos de ocho diferentes lámparas fluorescentes emisoras de bandas delgadas (371-750nm) y cuatro fuentes comerciales de luz fluorescente en el cultivo *in vitro* de tabaco. Las respuestas morfogénicas se presentaron en la luz ultravioleta al mostrar estimulación e inhibición en el crecimiento de callo y brotación, dependiendo de la intensidad de la luz. La estimulación del crecimiento y brotación ocurrió en la región de luz azul. El rojo y rojo lejano aparentemente no afectaron el crecimiento del tejido ni la estimulación de la brotación. Por otra parte, en plantas en reposo el peso seco de las hojas, tallos y raíces se incrementó bajo condiciones de luz adecuadas y decreció bajo la oscuridad. La reducción en el porcentaje de materia seca se favoreció con la intensidad de luz baja (Biran y Kofranek, 1981).

CALIDAD E INTENSIDAD DE LA LUZ

Sólo la luz del espectro visible, que es absorbida por una planta, puede ser usada para proveer de energía para el crecimiento. Dos grupos de pigmentos son particularmente importantes en las hojas de las plantas., clorofilas y carotenoides. Los carotenoides principalmente absorben la luz azul, mientras que las clorofilas absorben luz azul y roja (Heatcote, 2001).

En cuanto a pigmentos, la luz azul a bajas intensidades da origen a un aumento en la absorción de flavinas o carotenoides y a altas intensidades puede causar inhibición de la absorción de proteínas heme (Kowallik, 1982). Las diferencias en producción y en peso seco se asocia a lámparas con emisión de luz azul lo que coincide con un alto contenido de clorofilas en hojas (Moe, 1997).

El uso de calidades diferentes de luz aplicada en orquídeas (*Cattleya sp*) en cultivo *in vitro*, demostró que las fuentes de luz roja, amarilla y azul aumentan la germinación, y en pruebas de peso fresco y seco tuvieron mayor peso que las plantas cultivadas bajo la luz verde. La luz verde promovió un incremento en la longitud de brote y número de hojas, pero en peso fresco y seco, longitud y ancho de hoja y crecimiento de raíz su aumento fue mínimo (Obaidul, *et al.*, 1999).

Estudios realizados en individuos del género *Laelia*, cultivadas en invernadero muestran que éstas deben recibir una cantidad alta de luz y brillo del

sol pero de manera indirecta, para evitar su deshidratación, ya que la luz directa puede necrosar sus tejidos (Allikas, 2001).

Diodos emisores de luz (LED) pueden emplearse como generadores de luz para el cultivo *in vitro*, como está reportado para *Cyclamen persicum* en la cual la suma de diodos rojos y azules promovió la floración de la especie. (Wook; *et al.* 2003).

PLANTAS PROPAGADAS *IN VITRO*.

Morfológicamente las plantas producidas *in vitro*, difieren de las que son propagadas convencionalmente por semilla, las plantas cultivadas en tubos de ensayo tienen generalmente la cutícula escasamente desarrollada debido a la alta humedad relativa (90-100%) generada *in vitro*. Las hojas de una planta producida *in vitro*, son frecuentemente finas, blandas y fotosintéticamente poco activas, y en consecuencia mal adaptadas a las condiciones que se pueden encontrar *in vivo* (Pierik, 1990).

En plantas que provienen de una diferenciación celular, la conducción de agua entre vástagos y raíces puede verse reducida ya que no tienen un desarrollo vascular completo entre la raíz y la parte aérea. Es importante tener en cuenta que las plantas *in vitro* han sido cultivadas como heterótrofas, pero se deben comportar como autótrofas *in vivo* ya que el azúcar necesaria para realizar sus funciones debe ser producido por medio de la fotosíntesis (Pierik, 1990).

En las plantas que se generan *in vitro* el tejido vascular de la raíz no está totalmente desarrollado, no funcionan de forma adecuada, no tienen o tienen pocos pelos radicales además de que pueden sufrir daños durante el trasplante o mueren rápidamente debiendo ser sustituidas por nuevas raíces (Uosakainen *et al.*, 2000; Preece y Sutter; 1991; Granada y Villalobos, 1985).

Las actividades fisiológicas de las plantas producidas *in vitro*, son diferentes a las que crecieron autotróficamente, estos cambios implican el débil desarrollo del aparato fotosintético lo que puede ser un factor importante para que al momento del trasplante sean vulnerables a cualquier deficiencia en el ambiente, afectando su desarrollo y crecimiento durante el establecimiento. Por esto se hace necesario llevar a cabo procesos previos de aclimatización. (Pierik, 1990; Lewandowski, 1991).

ACLIMATIZACIÓN

Los procesos de aclimatación y aclimatización no son equivalentes, el primero se refiere a la fase durante la cual las plantas u otros organismos se acostumbran o habitan a un nuevo clima o situación, como resultado de un proceso natural. Aclimatización implica que el hombre ha intervenido y dirigido el proceso de adaptación. En general es el proceso de establecimiento en invernadero o campo de las plantas que provienen de condiciones *in vitro* (Preece y Sutter, 1991;

Lewandowski, 1991). Por lo anterior 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 (Lewandowski, 1991; Vázquez, 1994).

La etapa de establecimiento es un proceso crucial en la micropropagación. A pesar de que se han realizado numerosas investigaciones para optimizar las condiciones nutrimentales y de incubación en muchas especies, también ha se ha descuidado la investigación acerca de las cuestiones relacionadas con el establecimiento y manejo *in vivo* de las plantas producidas *in vitro* (Keithly *et al*, 1991).

La etapa de aclimatización representa un riesgo para la micropropagación, debido a la alta mortalidad, por lo que la habilidad para sobrevivir de las plantas producidas *in vitro* en este periodo, puede ser una limitante para el uso comercial del cultivo de tejidos vegetales. La pérdida de plantas una vez sacadas del medio aséptico puede exceder del 50 % durante los primeros 6 meses (Klerk, 2000 ; Uosukainen *et al*, 2000).

Como ya se mencionó las altas tasas de mortalidad de este proceso se deben principalmente al estrés hídrico, a la condición heterótrofa y a la parcial ineficacia radical, por lo que una aclimatización exitosa de las plantas regeneradas *in vitro* en general requiere de cuatro semanas, tiempo en el que se restablecen y regulan todas las funciones de las plantas minimizando la mortandad (Pierik, 1990; Uosukainen *et al*, 2000).

El desarrollo de las plantas provenientes de condiciones *in vitro*, dependen de la cantidad de nutrientes almacenados en los tejidos, posteriormente el crecimiento sólo es sostenido por las hojas formadas “*de novo*”. La acumulación de almidón y sacarosa como reservas nutritivas son la base para sobrellevar el periodo de estrés durante la aclimatización (Keithly *et al*, 1991). Por esto el hecho de que las hojas sean o no fotosintéticamente activas en el momento del trasplante, pasa a un segundo término debido a que el requerimiento primario es tener suficiente reserva de nutrientes durante la primera semana; una vez que las raíces y hojas nuevas se hayan desarrollado las condiciones de las que provienen las plantas *in vitro* ya no son determinantes (Debergh *et al.*, 2000).

Cuando las plántulas se aclimatizaron, los tejidos y órganos que se formaron *in vitro* no muestran cambios o estos son muy pequeños y no llegan a tener las características normales de una planta desarrollada *in vivo*. Los primeros órganos que se forman al inicio de la aclimatización tienen características intermedias entre los originales y los formados al final de la aclimatización que tienen un desarrollo normal y marcan el fin de dicho proceso (Preece y Sutter, 1991; Debergh *et al.*, 2000).

PROCEDIMIENTO DE ACLIMATIZACIÓN DE PLANTULAS OBTENIDAS *IN VITRO*

Para lograr la aclimatización es necesario tener en cuenta las siguientes consideraciones (Pierik, 1990):

1. Para evitar infecciones por hongos y bacterias:

- El agar debe ser completamente eliminado de las raíces.
- Utilizar sustrato esterilizado.

2. Inmediatamente después de su transferencia al sustrato se deben de tener controles fitosanitarios ya que las plantas *in vitro* son generalmente susceptibles a ataques de insectos y microorganismos.

3. La presencia de hongos debe de ser evitada con la aplicación de fungicidas al momento de la transferencia desde el tubo de ensayo.

4. Para evitar hacer daño a las raíces, es fundamental hacer el replante en sustratos finamente tamizados.

5. Para mejorar el establecimiento *in vivo* de plantas producidas *in vitro*, el enraizamiento deberá ser en un medio pobre en sales.

6. Las plantas que forman pseudobulbos deberán ser transferidas con esta estructura al tubo de ensayo al sustrato; así las posibilidades de supervivencia son mayores.

7. La aclimatización *in vitro*, especialmente cuando se expone a las plantas a una humedad relativa baja, disminuye la tasa de supervivencia. Si se transfieren a invernadero plantas *in vitro* se debe incrementar la humedad relativa y regular la irradiación lumínica.

SUSTRATOS PARA EL CULTIVO DE PLANTAS

Para el cultivo de plantas, es necesario emplear sustratos que permitan un crecimiento y desarrollo de la planta. Un sustrato es todo material sólido distinto del suelo, natural, de síntesis o residual, mineral u orgánico, que, colocado en un contenedor, en forma pura o en mezcla, permite el anclaje del sistema radicular, desempeñando, por tanto, un papel de soporte para la planta. El sustrato puede intervenir o no en el complejo proceso de la nutrición mineral de la planta (Maroto, 1990).

El mejor medio de cultivo depende de numerosos factores como son el tipo de material vegetal con el que se trabaja (semillas, plantas, estacas, etc.), especie

vegetal, condiciones climáticas, sistemas y programas de riego y fertilización, aspectos económicos, etc (Maroto, 1990).

Para obtener buenos resultados durante la germinación, el enraizamiento y el crecimiento de las plantas, se requieren las siguientes características del medio de cultivo (Llurba, 1997):

a) Propiedades físicas:

- Elevada capacidad de retención de agua fácilmente disponible.
- Suficiente aireación.
- Distribución del tamaño de las partículas que mantenga las condiciones anteriores.
- Baja densidad aparente.
- Elevada porosidad.
- Estructura estable, que impida la contracción (o hinchazón del medio).

b) Propiedades químicas:

- Alta capacidad de intercambio catiónico, dependiendo de que la fertirrigación se aplique permanentemente o de modo intermitente, respectivamente.
- Suficiente nivel de nutrientes asimilables.
- Baja salinidad.
- Elevada capacidad tampón y capacidad para mantener constante el pH.

c) Otras propiedades.

- Libre de semillas de malas hierbas, nematodos y otros patógenos y sustancias fitotóxicas.
- Reproductividad y disponibilidad.
- Bajo costo.
- Fácil de mezclar.
- Fácil de desinfectar y estabilidad frente a la desinfección.
- Resistencia a cambios externos físicos, químicos y ambientales.

CARACTERÍSTICAS DE ALGUNOS SUSTRATOS

AGROLITA

La agrolita es una roca volcánica vítrea llamada roca perlita que contiene agua en su estructura molecular. Este mineral triturado a tamaños determinados se calienta a altas temperaturas en hornos especiales obteniendo la expansión de las partículas de 4 a 20 veces el volumen. Mejora la estructura del suelo, estabilizando el pH del mismo (Terres *et al*, 1997).

CARBON ACTIVADO

El carbón activado tiene múltiples usos, entre los que cuales puede utilizarse como sustrato para el cultivo de Orquídeas. La estructura del carbón hace que el carbón tenga la capacidad de absorber y retener dentro de los poros otras sustancias, este fenómeno se conoce como “adsorción”.

La capacidad adsorbente del carbón natural es muy reducida ya que la mayor parte de los poros mas pequeños y útiles para la retención se sustancias están llenos con productos muy poco volátiles que no salieron durante el calentamiento normal del proceso, lo que se hace entonces para “activarlo” es calentarlo a temperaturas por encima de los 1000 grados centígrados con lo que queda “limpio” y con gran capacidad adsorbente (Terres *et al*, 1997).

ESFAGNUM

La turba de *Sphagnum* es un musgo que se acumula en las turberas pantanosas para formar una masa. Se encuentra en un agua muy ácida, con un pH de 4.0 aproximadamente, poco oxigenada y con un bajo contenido de minerales nutritivos. Con los años, los esfagnos se acumulan en la turbera y forman un "musgo". Debido a las condiciones naturales de los suelos pantanosos, esta turba de *Sphagnum* se descompone muy lentamente y, a lo largo de períodos de millares de años y puede formar un colchón de 1 a 6 metros de espesor. La turba de *Sphagnum* canadiense tiene una gran porosidad al aire, ofrece una retención de agua excelente y absorbe bien las materias nutritivas. Estas características favorecen el desarrollo de las raíces y de los brotes. Esta turba de *Sphagnum* está prácticamente exenta de malezas y de agentes patógenos (Terres *et al*, 1997).

TEZONTLE

El tezontle es una roca de origen volcánico formada por el enfriamiento y la solidificación de materia rocosa fundida (magma). Según las condiciones bajo las que el magma se enfríe, las rocas que resultan pueden tener granulado grueso o fino, puede ser de color rojo o negro, ofrece buen drenaje, casi nulo aporte de nutrientes y un pH ligeramente neutro (Terres *et al*, 1997).

FUENTES DE NUTRIENTES PARA LAS PLANTAS

Los nutrientes de las plantas pueden ser aportados al sustrato al agregar los siguientes materiales (García y Cuevas, 2000):

- Abonos orgánicos
- Fertilizantes químicos

ABONOS ORGÁNICOS.

Los abonos orgánicos o simplemente abonos, son materiales que provienen de restos de plantas o de animales vivos o muertos. Suministran materia orgánica al suelo en grandes cantidades y nutrientes para las plantas en pequeñas cantidades. Su efecto es lento, mejora la estructura, retención de la humedad y la fertilidad del suelo. Como ejemplos pueden mencionarse los abonos verdes, estiércoles, las compostas, sangre seca, etc. (García y Cuevas, 2000).

FERTILIZANTES

Son materiales inorgánicos que contienen al menos uno de los tres elementos principales (N, P, K) pudiendo contener además, otros nutrientes (Mg, Bo, Zn, Fe). Algunos de ellos son el sulfato de amonio, la urea, superfosfato de calcio, cloruro de potasio, etc. Para el desarrollo y la producción eficiente, las plantas usualmente requieren mayores cantidades de nutrientes de los que contiene la solución del suelo en determinado momento. Por esta razón, la aplicación de fertilizantes es indispensable, pues la velocidad de restitución por intercambio catiónico de nutrientes provenientes de los minerales, comparada con las necesidades, es demasiado lenta (García y Cuevas, 2000).

LOS ABONOS INORGÁNICOS O FERTILIZANTES QUÍMICOS

Los fertilizantes se pueden clasificar, según su composición, en simples y compuestos. Los fertilizantes simples contienen un solo elemento principal (N, P, K). Los fertilizantes compuestos son los que contienen más de un elemento principal (García y Cuevas, 2000).

PRESENTACIÓN FÍSICA

Esta característica del fertilizante es importante porque a menudo determina las condiciones de su uso y la eficacia del mismo (García y Cuevas, 2000).

Las presentaciones son las siguientes:

- Sólido: Como la urea
- Líquido. Como el agua amoniacal
- Gaseoso. Como el amoniaco anhidro

A su vez, los fertilizantes sólidos pueden ser:

- En polvo.
- Cristalinos.
- Granulados. El 90 % de las partículas debe presentar diámetros entre 1 y 4 mm. La forma deseable es la esférica.

- Perlado. Es granulado de tamaño muy uniforme.

VENTAJAS DEL USO DE FERTILIZANTES

- La incorporación de los nutrientes al suelo y por lo tanto su utilización es inmediata.
- Es posible determinar con relativa exactitud los aportes de elementos nutritivos según las necesidades del cultivo y el aporte del suelo.
- Sus formas físicas de presentación son variadas lo que facilita su manejo según las características del suelo y del cultivo (García y Cuevas, 2000).

DESVENTAJAS DEL USO DE FERTILIZANTES

- En algunos casos son insumos que elevan los costos.
- Pueden modificar los niveles de pH, según el efecto ácido o básico que tengan en el sustrato.
- Pueden favorecer la lixiviación de otros nutrientes.
- Pueden causar contaminación del suelo o del manto freático (García y Cuevas, 2000).

FERTILIZACIÓN DE ORQUÍDEAS

Sessler (1978), recomendó utilizar para los géneros *Cattleya*, *Epidendrum* y *Laelia* los tratamientos a base de nitrógeno, fósforo y potasio: 20-10-10, 20-20-20 y para inducir la formación de yemas florales y floración 10-30-20. El tratamiento 30-10-10, es alto en nitrógeno ideal para las plantas que crecen sobre corteza.

Hean (1982), señala que la aplicación foliar de cloruro de aluminio a 500 p.p.m. o ácido bórico a 1000 p.p.m. incrementa la duración de las inflorescencias de *Oncidium* cv. *Gloriana* cuando las inflorescencias son cortadas y sujetas a nutrición con la solución en agua destilada. En sustrato las plantas de *Oncidium* cv. *Gloriana*, asperjadas con molibdato de amonio a 100-1000 p.p.m. o ácido bórico a la misma concentración, incrementa la producción foliar durante la floración.

En plantas epifitas Benzing (1989) y Pridgeon, (1987) realizaron pruebas de permeabilidad d iones calcio, azufre y fósforo en la superficie foliar de bromelias y orquídeas. Las hojas de bromelias son más permeables a estos iones que las de orquídea. Las primeras son capaces de rehidratarse completamente a diferencia de las segundas que solo se rehidratan parcialmente.

Salinger (1991) menciona que se pueden utilizar fertilizantes de lenta liberación para *Cymbidium*, como el osmocote® que pueden ser de corto plazo (1-4 meses) o de largo plazo (cada ocho meses).

Al realizar un estudio sobre la disponibilidad de nitrato y amonio, en dos orquídeas terrestres (*Bromheadia finlaysonia* y *Cymbidíum sínense*) y una orquídea epífita (*Dendrobium*), se estableció que los intervalos de asimilación de nitrato y amonio son lineales. Con altos intervalos de asimilación para amonio, la asimilación para nitrato fue en intervalos considerablemente bajos (Hew et al., 1993).

Manrique (1993) encontró que las orquídeas necesitan pequeñas cantidades de fertilizantes ya que tienen un crecimiento lento, menciona que para *Cymbidium* y *Phalaenopsis* las aplicaciones de 100, 50 y 25 mg de N, K y Mg respectivamente por kilogramo de sustrato son adecuados; para *Cattleya* se obtiene un crecimiento óptimo con 50 mg de N, P y K respectivamente por kg.

Wang y Greg (1994), utilizaron la fórmula de concentración 20-8.6-16 durante dos ciclos de floración, con tres niveles (0.25, 0.5 y 1.0 g L⁻¹) en el agua de riego a plantas maduras. Las plantas presentaron diferencias significativas en emergencia de la inflorescencia, días a floración, día de la emergencia y floración de *Phalaenopsis*, siendo los mejores niveles: 0.25 y 0.50 g L⁻¹ y para la longitud del tallo 1.0 g L⁻¹.

Los propagadores de orquídeas del pasado tenían la idea que la fertilización era perjudicial para las plantas; sin embargo, estas necesitan nutrimentos y la mejor práctica es fertilizar por medio del agua de riego. El fertilizante depende del sustrato donde crece la planta. (Espinosa, 1997)

Las orquídeas deberán fertilizarse cada dos semanas durante el año para obtener un crecimiento máximo. La osmunda, maquique, mezclas de tierra, se deben fertilizar con un balance 10-10-10. La corteza de abetos u otras especies se deberán fertilizar con una fórmula 30-10-10; los medios de corteza requieren una cantidad adicional de nitrógeno para balancear la requerida por la gran cantidad de microorganismos descomponedores. (Espinosa, 1997). Cabe mencionar que la aplicación de fertilizantes depende directamente de la especie y de su estado de desarrollo en el que se encuentre.

El efecto de fertilizantes altos en fósforo produjo en *Phalaenopsis* una baja producción en la floración a diferencia del grupo control. Este incremento en la concentración de fósforo por periodos prolongados de tiempo, tuvo como resultado el enrojecimiento de la superficie foliar y la pérdida algunas hojas, además, limitó la producción de renuevos foliares (Wang, 2000).

Cui, y colaboradores (2004), utilizaron soluciones nutritivas a diferentes concentraciones (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 g/l); de las cuales, la concentración de 1.5 incrementó la cantidad de hojas, así como el área de la misma, elevando así, la tasa fotosintética en *Doritaenopsis* (híbrido entre orquídeas del género *Doritis* y *Phalaenopsis*). Sin embargo, esta concentración y la de 2.0 tuvieron un efecto negativo en la floración, ya que el tamaño de las flores obtenidas fue menor que

los otros tratamientos y promovió la aparición de malformaciones en las flores. También hubo daño al sistema radical al aplicar estas altas concentraciones. La concentración de nutrimentos de 1.0 y 0.5 obtuvieron una mayor producción de flores.

En estudios realizados con *Cymbidium hybridum*, el nitrógeno fue el factor más importante en el crecimiento de las hojas, el fósforo en la floración. La tasa óptima de N-P-K (1:3.3:1.2) obtuvo la mayor floración. Esta tasa óptima fue determinada usando los índices de crecimiento foliar, peso fresco, contenido clorofílico, la tasa de fotosíntesis neta y el número de flores (JiuZhou, 2005).

Los efectos de los nutrientes (N-P-K) sobre la diferenciación y calidad floral de *Cymbidium hybridum* tuvo como resultado que el potasio (K) es un factor que determina la brotación de hojas y número de brotes florales. El efecto del nitrógeno (N) fue significativo en el desarrollo de pseudobulbos, calidad floral y número de flores por inflorescencia, el efecto de fósforo (P) fue incidente en el número de flores, aunado con el potasio, el diámetro floral fue el que obtuvo los mejores resultados (YunZhai y SiQing, 2005).

FACTORES QUE AFECTAN LA ABSORCIÓN DE NUTRIMENTOS EN ORQUÍDEAS

De las diferentes propuestas para explicar la baja absorción de nitrato por las orquídeas, se ha determinado que la estructura de la raíz juega un papel muy importante en la absorción de iones. Estudios realizados al velamen, demostraron que este influye en el flujo de nitrato y de amonio (Pridgeon, 1987 y Benzing, 1989).

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 y durante el tiempo seco las células están llenas de aire; cuando llueve, quedan llenas de agua (Esau, 1985).

ALTERACIONES NUTRICIONALES EN ORQUÍDEAS

Baker y Baker (1998) describen la sintomatología de las deficiencias y excesos nutrimentales más importantes manifestadas en las orquídeas, y que son:

NITRÓGENO

Exceso: Ennegrecimiento de hojas. Crecimiento nuevo quebradizo. Hojas verde-oscuras. El nuevo brote es débil y alargado. Niveles altos pueden incrementar la susceptibilidad a enfermedades.

Deficiencia: Clorosis en hojas viejas. Coloración rojiza o purpúrea en hojas. Poco crecimiento. Pérdida excesiva de nitrógeno que causa ennegrecimiento de hojas, el cual también puede resultar por muy bajas temperaturas. Deficiencia de nitrógeno resulta cuando el fertilizante no es utilizado con la frecuencia recomendada. Un exceso de fósforo o potasio pueden causar síntomas de deficiencia de nitrógeno.

FÓSFORO.

Exceso: Hojas cloróticas, curvadas o abarquilladas y que se caen prematuramente. Presentan manchas café o cierto amarillamiento o blanqueado del tejido de las hojas.

Deficiencia: Hojas verdes con coloraciones rojizas o púrpuras. Defoliación prematura de hojas. Hojas purpúreas. Floración reducida. Nuevos brotes alargados.

Observaciones: Deficiencias pocas veces ocurren si el fertilizante está bien balanceado, a menos que se utilicen niveles altos de nitrógeno exclusivamente. El crecimiento alargado y descolorido tal vez se deba a niveles bajos de luz. Pobre floración debido al bajo nivel de luz, fotoperíodo incorrecto, insuficiente descanso o temperaturas no apropiadas.

POTASIO.

Exceso: Reducido crecimiento, brotes débiles y alargados. Hojas cloróticas, curvadas o abarquilladas y que se caen prematuramente. Moteado café, amarillo a blanco del tejido de las hojas. Susceptibles a enfermedades.

Deficiencia: Quemaduras del margen, clorosis, manchas necróticas, arrugamiento entre las venas y amarillamiento de los márgenes en hojas. Entrenudos cortos. Plantas enanas. El balance nitrógeno/potasio es importante (altas concentraciones de N y bajo nivel de K favorece el crecimiento vegetativo; bajos niveles de N y altos niveles de K promueve el crecimiento reproductivo).

CARACTERÍSTICAS DE LOS MÉTODOS DE FERTILIZACIÓN.

FERTILIZACIÓN POR ABSORCIÓN FOLIAR

La absorción foliar se define como el paso de sustancias a través de la cutícula de las hojas. A pesar de la gran importancia de la raíz como zona de absorción existen varios factores que han impulsado la introducción de nutrimentos por esta vía, entre los que se pueden mencionar: a) el costo de los fertilizantes, b) la contaminación ambiental debido a los lavados y escurrimientos de las aplicaciones al suelo, c) el hecho de permitir que la planta obtenga los nutrimentos que necesita cuando algunas condiciones del sustrato son adversas

como las bajas temperaturas, las inundaciones o que haya fijación del elemento, d) el que en muchos casos la cantidad de nutrimentos a aplicar es tan pequeña que una aspersión foliar es mucho más eficaz y se prefiere a las aplicaciones al sustrato ya que se evitan problemas de dilución o de fijación, e) el que la respuesta de la planta sea rápida ya que se agrega la sustancia directamente al sitio de interés y f) cuando la demanda de nutrimentos es mayor que lo que absorbe la raíz (Acosta, 1991).

Por otro lado, algunas de las desventajas de la absorción foliar son: a) que cuando se utilizan aspersiones de macroelementos se requieren varias aplicaciones para introducir una cantidad adecuada de nutrimentos que afecte significativamente el rendimiento, b) que puede haber quemaduras cuando se usan concentraciones altas y c) que siempre es más económico aplicar los nutrimentos al sustrato (Acosta, 1991).

FERTILIZANTES DE DISPONIBILIDAD CONTROLADA

Según Urbano (1999), la liberación controlada de los nutrientes contenidos en los fertilizantes genera interés en tres aspectos principales: agronómico, medioambiental e industrial. Con estos fertilizantes es más viable un cultivo de altos rendimientos conservando la fertilidad del suelo y reduciendo los riesgos ambientales.

Los gránulos de fertilizantes solubles se recubren con cierto tipo de membrana que regula la tasa en que la atraviesan los fertilizantes y quedan disponibles para las plantas. El retraso en la liberación inicial de los nutrientes y el mantenimiento del ritmo de liberación durante el desarrollo del cultivo se llevan a cabo mediante el control de la solubilidad en el agua de la cubierta semipermeable que contiene a los nutrientes, la hidrólisis de las moléculas, entre otras.(Urbano, 1999).

FERTILIZANTES GRANULARES

Los fertilizantes granulares son fertilizantes complejos que contienen normalmente nutrientes como nitrógeno, fósforo y potasio en una forma soluble, lo cual genera que al diluirse y aplicarse presente mayor disponibilidad en la raíz de la planta. Una de las principales ventajas es el bajo costo ya que existe una gran variedad de mezclas y proporciones de acuerdo a las necesidades del cultivo. Entre las desventajas se encuentra: la necesidad de hacer varias aplicaciones distribuidas a lo largo del periodo completo de crecimiento; el incremento de la contaminación ambiental debido a los lavados y escurrimientos de las aplicaciones al sustrato; la variación en su efectividad se puede deber a inundaciones u otras condiciones que no permitan su fijación del elemento y finalmente, la disponibilidad del nutrimento para la raíz.

***Laelia autumnalis* (La Llave & Lexarza) Lindley ORCHIDACEAE**

Los botánicos mexicanos Pablo de la Llave y Juan Lexarza describieron la especie como *Bletia autumnalis*, en 1825, basándose en plantas colectadas en la región de Valladolid (hoy Morelia). Cuando John Lindley estableció el género *Laelia* en 1831, transfirió inmediatamente esta especie al género *Laelia* y desde entonces es conocida como *Laelia autumnalis* (Fig. 12) (Halbinger, 1993). Comúnmente a esta especie se le conoce como "Flor de las ánimas", "flor de todos santos", "flor de encino", "flor de la calavera", "lirio de San Francisco".



Figura. 12. Flor de *Laelia autumnalis* (La Llave & Lexarza) Lindley

DESCRIPCIÓN

Son plantas epifitas, ocasionalmente litófitas, se distinguen por los pseudobulbos oblongos, alargados, longitudinalmente arrugados, con 1-3 hojas oblongas, agudas, arqueadas, de hasta 17 cm. de largo y 3.8 cm. de ancho. La inflorescencia de 40-70 cm. de largo, con un racimo de 5 a 12 flores que abren en sucesión. Las flores son variables en tamaño, de 7 a 10 cm. de diámetro, con una fuerte fragancia en días con sol. (Fig. 13) Los sépalos lanceolados y los pétalos oblongo- lanceolados púrpura o lila. El lóbulo medio del labelo es ligeramente enrollado, de color más oscuro, los lóbulos laterales son erectos, blancos y con rayas rojas, bifurcadas en la garganta y en el centro 3 quillas amarillentas (Halbinger, 1993).

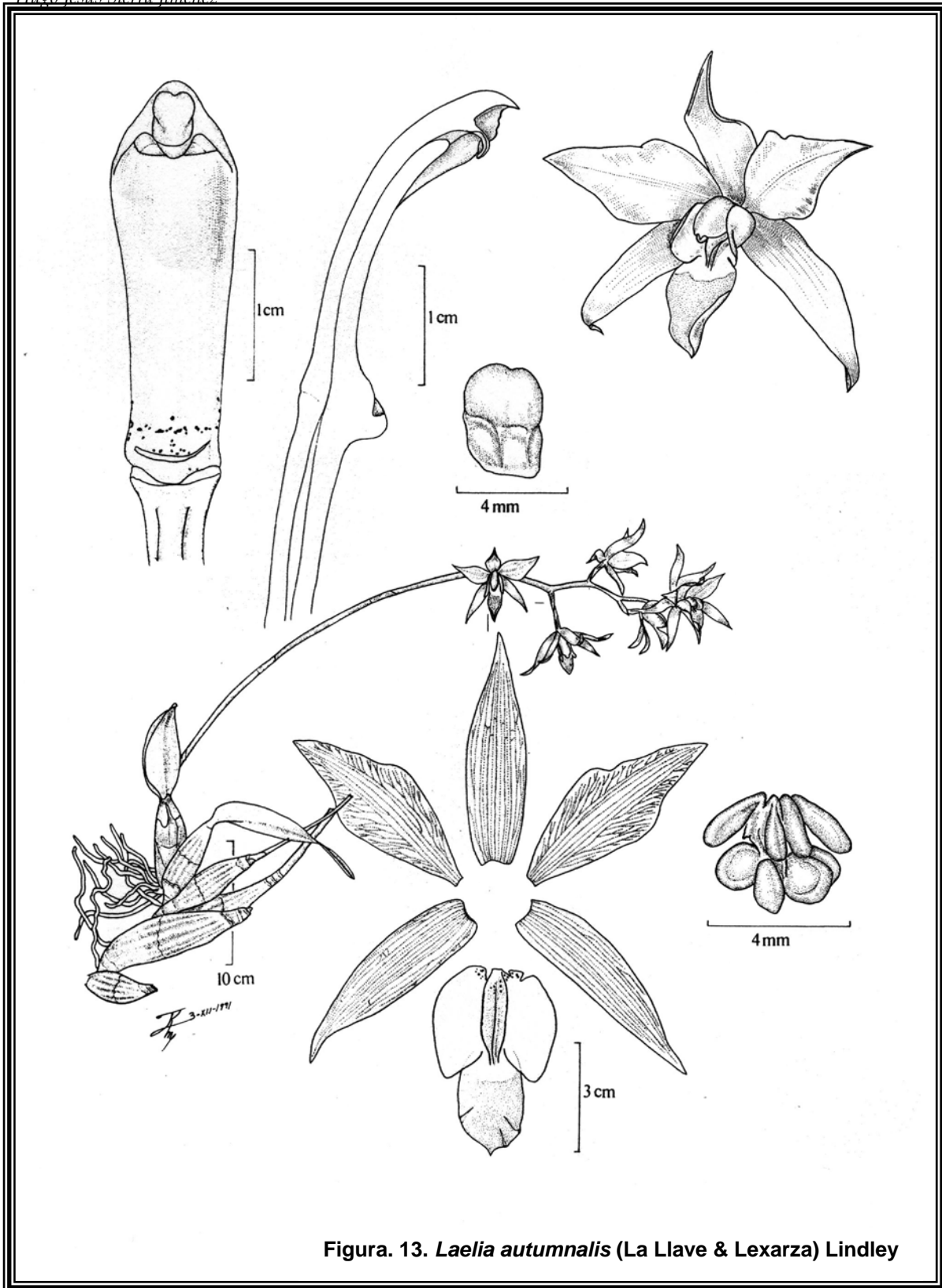


Figura. 13. *Laelia autumnalis* (La Llave & Lexarza) Lindley

DISTRIBUCIÓN

Las especies del género *Laelia* de origen mexicano son principalmente habitantes de las montañas. Casi todas las especies están distribuidas en los rangos occidentales del país (la Sierra Madre Occidental, Eje Neo-Volcánico Transversal, y la Sierra Madre del Sur), mientras que en el Golfo de México, particularmente en la Sierra Madre Oriental, se encuentran sólo dos especies, *Laelia anceps* y *Laelia speciosa*. El Istmo de Tehuantepec puede ser considerado como una barrera natural para las especies del género *Laelia* de México, sólo tres especies, *Laelia anceps*, *Laelia rubescens* y *Laelia superbiens* crecen en ambos lados de él. Hay varias especies de *Laelia* que crece sobre 2000 m de elevación (Halbinger y Soto, 1997).

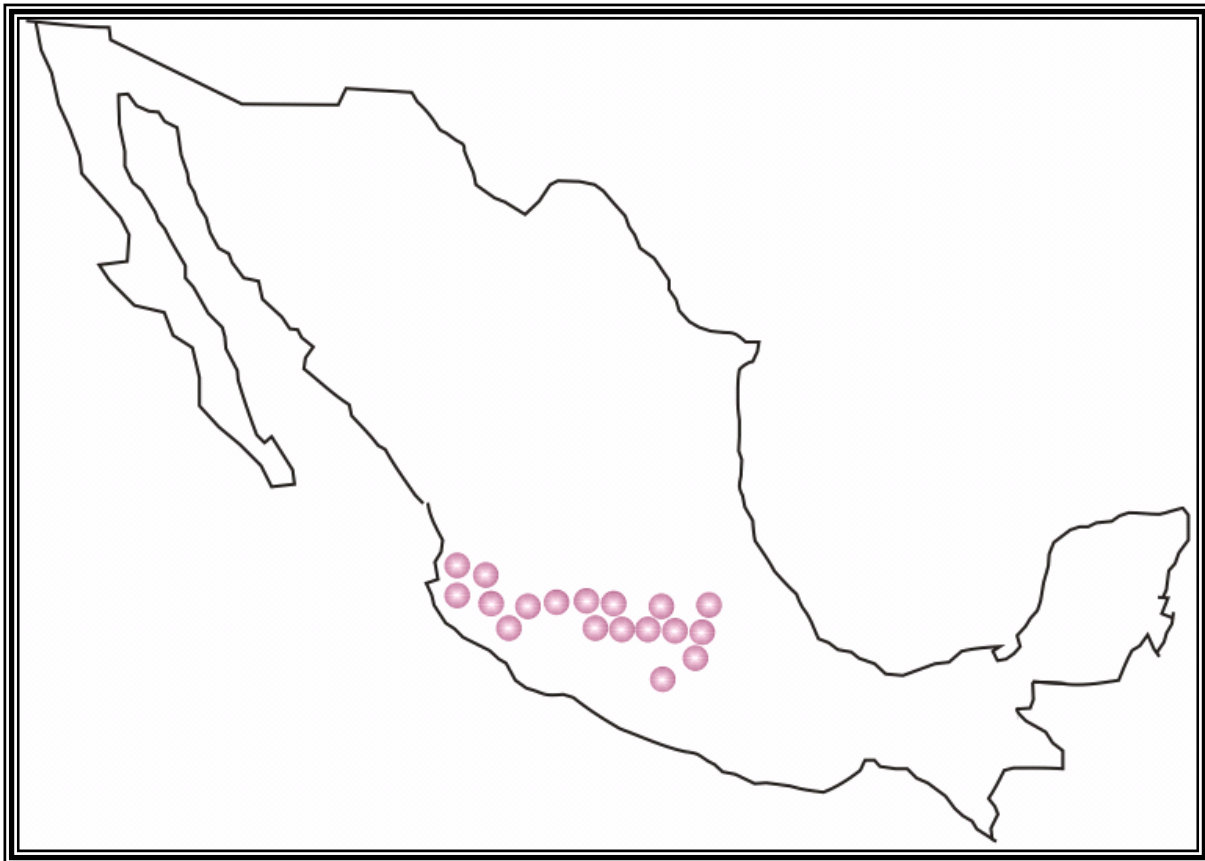


Figura. 14. Distribución geográfica conocida de *Laelia autumnalis* (Halbinger ,1993).

Laelia autumnalis es una orquídea típica de las montañas del centro de México (Fig. 14) y ha sido colectada en los estados de Colima, Distrito Federal, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos y Nayarit (Halbinger, 1993).

EPOCA DE FLORACION

La mayoría de las especies del genero *Laelia* florecen de septiembre a noviembre (Fig. 15) y ocasionalmente hasta diciembre (Halbinger, 1993).

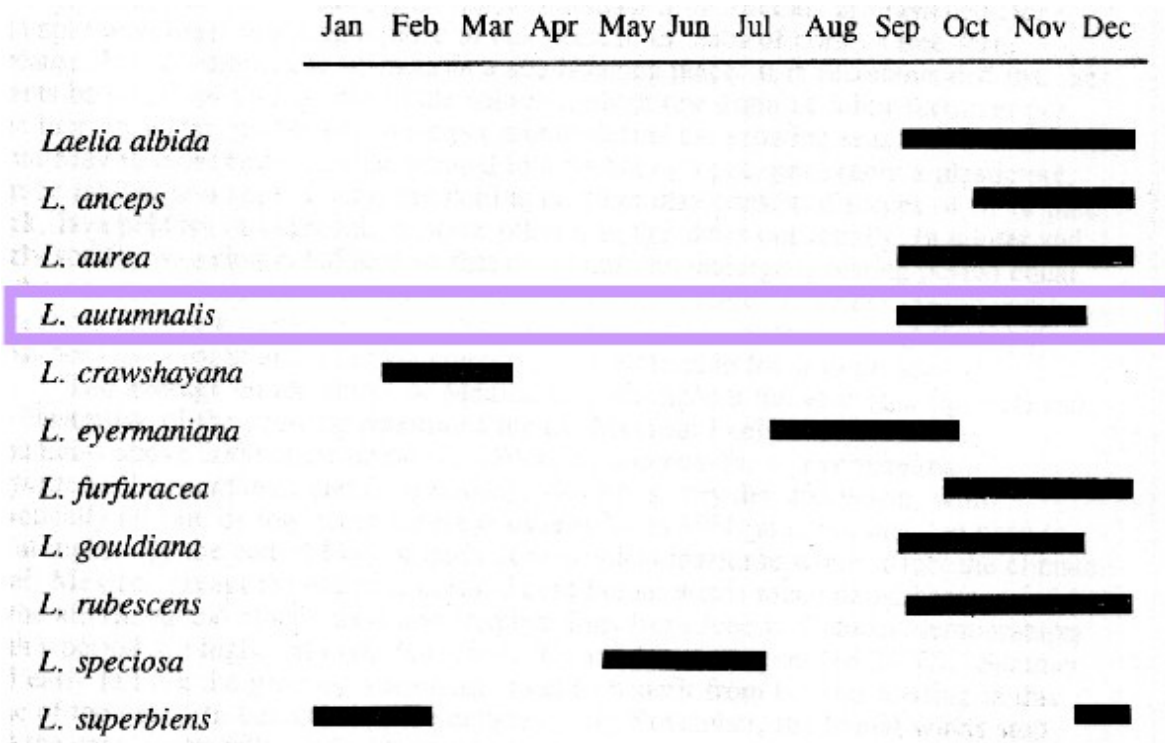


Figura 15. Floración de algunas especies de *Laelia*

HIPÓTESIS

GENERAL

Los factores físicos y químicos (luz, humedad, fotoperíodo, nutrientes minerales, calidad del sustrato) intervienen en el crecimiento y desarrollo durante la germinación *in vitro* y el establecimiento *ex vitro*, por lo que la modificación de dichos factores, desencadenará diversas respuestas morfológicas y fisiológicas en el cultivo de *Laelia autumnalis*.

PARTICULARES

- Durante la germinación *in vitro* de semillas de *Laelia autumnalis*, la luz es uno de los factores que interviene en este proceso, por lo que cualquier variación en su composición espectral afectará el crecimiento y desarrollo de las plántulas cultivadas *in vitro*.
- El establecimiento de las plantas provenientes de ambientes *in vitro* resulta un paso crucial en la micropropagación, esto, debido a su alto índice de mortalidad, por lo cual, las propiedades de las mezclas de sustratos como la textura, porosidad, estructura, entre otras, serán determinantes en la capacidad de aclimatización de las plantas a condiciones *ex vitro*.
- El nulo aporte de nutrientes en los sustratos inertes, como la agrolita, permiten controlar el suministro de fertilizantes, por lo que, la eficiencia en la disponibilidad de dichos nutrimentos de acuerdo al tipo y forma de aplicación, será un factor que regulará el crecimiento y desarrollo de las plantas de *Laelia autumnalis*.

OBJETIVOS

GENERAL:

Estudiar el proceso de germinación asimbiótica y desarrollo *in vitro* y el crecimiento *ex vitro* de las plantas de *Laelia autumnalis* (La Llave & Lexarza) Lindl. bajo diferentes regímenes ambientales y nutrimentales.

PARTICULARES:

- Caracterizar morfológicamente las fases de germinación y formación de plántulas de *Laelia autumnalis*.
- Determinar y evaluar la influencia de la calidad de la luz en la presencia de pigmentos fotosintéticos y secundarios durante la germinación y desarrollo *in vitro* de las plántulas de *Laelia autumnalis*.
- Evaluar el efecto del espectro lumínico recibido en la producción de biomasa durante la germinación y el desarrollo *in vitro*.
- Evaluar el efecto de distintas mezclas de sustratos, tipo y método de fertilización en el cultivo *ex vitro* de *Laelia autumnalis*.

MATERIALES Y METODOS

CULTIVO IN VITRO

MATERIAL BIOLÓGICO.

Se utilizaron semillas maduras y viables provenientes de frutos dehiscentes de plantas cultivadas en invernadero, estas, fueron almacenadas en oscuridad, con baja humedad relativa (utilizando un desecador con cloruro de calcio anhidro) a una temperatura de 6° C. Esto para mantener la viabilidad de las semillas.

DESINFESTACION DE LAS SEMILLAS.

Las semillas se colocaron en 34 sobres de papel filtro, conteniendo como un mínimo 100 semillas cada uno. Estos paquetes se sometieron a un proceso de desinfestación (ver ANEXO I) (McKendrick, 2000). De ahí se tomaron dos sobres para verificar la viabilidad del lote de semillas (ver ANEXO I).

SIEMBRA IN VITRO DE LAS SEMILLAS

Una vez que las semillas fueron desinfestadas se tomaron los sobres y se abrieron con la ayuda de unas pinzas o una aguja de disección. Cada sobre abierto se depositó en una de las 32 cajas petri con el medio nutritivo (ver ANEXO I).

CONDICIONES DE INCUBACIÓN.

Después de la siembra las semillas, las cajas petri se mantuvieron en una sala de incubación a $24^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$, con fotoperíodo de 16 horas luz por 8 de oscuridad y con iluminación (proveniente de lámparas fluorescentes "luz de día" Osram 75 W) filtrada con filtros de material plástico delgado y flexible, a manera de papel transparente de diversas tonalidades: rojo (750-625nm), naranja (625-595nm), amarillo (595-574nm), verde (574-490nm), azul (490-435nm) o violeta (435-400nm) bajo las siguientes consideraciones:

- a) Se realizaron cuatro repeticiones por composición espectral (filtros), cuatro para el testigo (sin filtro, con luz directa de las lámparas fluorescentes) y cuatro para el tratamiento en oscuridad.
- b) Se evaluaron periódicamente las cajas petri durante 4 meses (primero c/ semana, para verificar que no existiera contaminación alguna y posteriormente c/15 días). Se registró el estado e índice de desarrollo en que se encontraba *Laelia autumnalis* de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$I.D. = \sum_{x=1}^{x=6} (e_x/e)(x)(100)$$

Donde:

x = Número de estado de desarrollo.

e_x = Número de individuos registrados en ese estado de desarrollo.

e = Total de individuos en muestra.

- c) Se midió la intensidad de luz que recibirán las semillas a través de los filtros y sin ellos con un fotómetro.

PRUEBAS POSTERIORES

- 1) Se estableció la tonalidad de la pigmentación foliar con una carta de colores para tejidos vegetales Munsell para establecer diferencias al comparar tonos de color del tejido foliar entre los tratamientos sometidos a luz filtrada.
 - Se emplearon muestreos al azar de plántulas juveniles, al momento de obtenerlas del cultivo *in vitro*.
 - La evaluación se efectuó bajo una lámpara de luz blanca.
 - La tonalidad de la tabla se comparó con el haz de la hoja de las plántulas.
 - Se registro el valor por tabla definida como un punto con tres dimensiones: Munsell *Hue* (H), Munsell *Value* (V) y Munsell *Chroma* (C), que se escriben como $H V/C$, fórmula conocida como "Notación Munsell".
- 2) Se registraron los pigmentos fotosintéticos presentes en las plantas al final del estudio en cada prueba experimental, por medio de una separación y extracción por solventes orgánicos siguiendo la metodología de separación de pigmentos hidrosolubles y liposolubles de la siguiente manera:
 - Se pesó 1 g. de hojas de *Laelia autumnalis* y se trituraron con arena fina.
 - Se agregaron 5 ml de acetona y se machacó el contenido.
 - Se filtró en una probeta y se agregó una cantidad de éter de petróleo igual a la obtenida de acetona con pigmentos.
 - Se puso la mezcla en un embudo de separación y se agitó.
 - Se dejó reposar y se agregaron 4 ml de agua destilada.
 - Se mezcló por rotación y se dejó reposar hasta que se notó la separación de las 2 fases.
 - Se obtuvo la fase concentrada con los pigmentos y se analizó la muestra obtenida en el espectrofotómetro.
- 3) Se cuantificaron las clorofilas a , b y *totales* presentes en el extracto. El cálculo para determinar la cantidad de clorofila, (expresándola como mg de

clorofila por *gramo* de tejido extraído) se realizó de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clorofila } a = 12.7(663 \text{ nm}) - 2.29(645 \text{ nm}) \times \frac{\text{ml mezcla}}{1000 \times \text{g planta}}$$

$$\text{Clorofila } b = 22.9(645 \text{ nm}) - 4.68(663 \text{ nm}) \times \frac{\text{ml mezcla}}{1000 \times \text{g planta}}$$

$$\text{Clorofila total} = 20.2(645 \text{ nm}) + 8.02(663 \text{ nm}) \times \frac{\text{ml mezcla}}{1000 \times \text{g planta}}$$

Donde:

nm = Absorbancia registrada en el espectrofotómetro a dicha longitud de onda.

ml mezcla = Volumen total de los pigmentos y disolventes expresados en mililitros.

g planta = Peso total de las plántulas empleadas expresado en gramos.

- 4) Se realizó la cuantificación de la biomasa, tanto de hoja como de raíz de las plántulas desarrollada bajo cada calidad de luz, por medio de la evaluación del peso seco, esto, al someter las plántulas a la eliminación de agua en una mufla, hasta llegar a un peso constante.,
- 5) Se analizaron los datos estadísticamente con el programa STATGRAPHICS Plus 5.0 y Microsoft Excel para una comparación de medias, así como prueba de Tukey para establecimiento de diferencias significativas entre tratamientos.

ACLIMATIZACIÓN DE LAS PLANTAS A CONDICIONES *EX VITRO*.

Las plántulas restantes obtenidas *in vitro*, con un rango de 4-5 hojas y sistema radical desarrollado, fueron sometidas al proceso de aclimatización, para esto se probaron 6 sustratos. Las plantas fueron retiradas de los frascos eliminando el agar adherido a las raíces. Se eliminaron las estructuras muertas (hojas, raíces) que pudieran ser una vía de infección para la planta. Posteriormente se les realizó un baño con solución fungicida de acción sistémica (Benlate® 1g/L). Una vez realizado este tratamiento se procedió a plantar en los sustratos experimentales.

Se evaluaron 4 sustratos inertes empleados regularmente en el cultivo de orquídeas en invernadero, con diferentes propiedades y estos fueron: esfagnum, agrolita (tamizada para obtener partículas de 0.5 cm³), carbón activado y tezontle rojo (en partículas de entre 0.5 y 1.0 cm³). Estos fueron lavados (a excepción del esfagnum) y sometidos a esterilización en autoclave a 1.5 Kg/cm² durante 30 minutos a 120°C de temperatura. Este procedimiento se realizó para eliminar completamente fuentes de contaminación como insectos, hongos o bacterias que pudiera afectar el desarrollo de las plantas recién extraídas *in vitro*.

Una vez obtenidos los sustratos estériles, se hicieron seis mezclas de la siguiente manera:

- Agrolita y Esfagnum (2:1) – AS 2:1
- Carbón y Esfagnum (2:1) – CS 2:1
- Tezontle y Esfagnum (2:1) – TS 2:1
- Carbón, Agrolita y Esfagnum (1:1:1) – CAS1:1:1
- Carbón, Tezontle y Esfagnum (1:1:1) – CTS1:1:1
- Tezontle, Agrolita y Esfagnum (1:1:1) – TAS1:1:1

Para esta prueba se hicieron 30 repeticiones por tipo de mezcla con una planta por maceta por cada repetición.

Las plantas de 6 meses de edad se colocaron en recipientes (botellas de pet) con la mezcla experimental. Se utilizaron botellas de pet con un corte transversal para permitir el trasplante y posteriormente fue sellado para crear un microclima, asemejando las condiciones *in vitro*. Después de ser trasplantadas, se trasladaron a una sala de aclimatización con fotoperíodo de 16 horas luz por 8 horas de obscuridad, a una temperatura de 21°-25°C. Durante la aclimatización se fue abriendo la botella paulatinamente desenroscando la tapa plástica a razón de una vuelta cada tercer día hasta retirar la tapa, posterior a este paso se hizo un corte en la parte superior de la botella y finalmente se eliminó la parte superior de la botella a los 30 días de transcurrida la prueba, esto con el fin de reducir gradualmente la humedad relativa dentro de la botella.

Hugo Jesús Sierra Jiménez

Se llevó a cabo el riego por aspersión con agua destilada cada tercer día para evitar deshidratación y se hizo una aplicación de fungicida sistémico (Benlate® 1g/L) a manera de prevención, que se aplicó cada 15 días durante el riego.

Durante el periodo experimental de tres meses (siendo este el periodo crítico de aclimatización de las plantas extraídas *in vitro*.) se realizó la evaluación cada mes y medio (45 días) a través del conteo del número de hojas, número de raíces, longitud de la hoja mayor, longitud de la raíz mayor y peso fresco. Al transcurrir el tiempo se registró el Índice de Supervivencia (IS) en las diferentes mezclas de la siguiente manera:

$$IS = \left(\frac{\# \text{ plantas vivas}}{\# \text{ plantas vivas} + \# \text{ plantas muertas}} \right) (100)$$

Las plantas se retiraron de su sustrato, se les realizó un lavado para quitar el sustrato adherido, al terminar, se pesaron los ejemplares en una báscula digital, se hizo el conteo total de hojas y raíces por planta y posteriormente con ayuda de un vernier, se tomaron medidas de las longitudes de la hoja y raíz más largas. Después de las mediciones se volvieron a plantar las orquídeas.

Se seleccionó la mezcla de sustratos que indujo el mejor desarrollo de las plantas de acuerdo a una comparación de medias y una prueba de significancia de Tukey. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente en el programa STATGRAPHICS Plus 5.0

FERTILIZACION DE PLANTAS

Una vez terminada la prueba de sustratos, se eligieron las plantas mejor desarrolladas y el mejor sustrato para las pruebas de fertilización. Estas pruebas pretendieron evaluar el crecimiento y desarrollo de las plantas, esto, bajo diferentes tipos de fertilizantes y métodos de aplicación. Para esta prueba se emplearon tres tipos diferentes de fertilizantes según su forma de aplicación:

- Fertilizante foliar (Folifertil® 20:20:20)
- Fertilizante granular (Peters® 20:20:20)
- Fertilizante de disponibilidad controlada (Osmocote® 13:13:13)

Los fertilizantes (disueltos en agua destilada en el caso de los fertilizantes foliares y granulares) se aplicaron en diversas dosis en los tiempos establecidos, mientras que los días restantes se suministró el riego por aspersión con agua destilada. A los lotes tratados con fertilizante granular y de disponibilidad controlada se les regará foliarmente para igualar la humedad respecto a los otros lotes. Para esto, se realizaron las siguientes pruebas:

Lote1 (TESTIGO)

- Riego diario por aspersión (10 ml aprox.) con agua destilada, sin fertilizante.

Lote 2 (FOLIFERTIL)

- Aplicación foliar en una concentración de 1 g/L cada 15 días.

Lote 3 (FOLIFERTIL)

- Aplicación foliar en una concentración de 0.5 g/L cada 7 días.

Lote 4 (FOLIFERTIL)

- Aplicación foliar en una concentración de 0.1 g/L diariamente.

Lote 5 (PETERS)

- Aplicación en el sustrato en una concentración de 1 g/L cada 15 días.

Lote 6 (PETERS)

- Aplicación en el sustrato en una concentración de 0.5 g/L cada 7 días.

Hugo Jesús Sierra Jiménez

Lote 7 (PETERS)

- Aplicación en el sustrato en una concentración de 0.1 g/L diariamente

Lote 8 (OSMOCOTE)

- Aplicación única del fertilizante en una concentración de 1.4 g por maceta.

Se hicieron 10 repeticiones por testigo, tipo de fertilizante y concentración con una planta por maceta por cada repetición. Durante el periodo de prueba se llevó a cabo una medición mensual para la evaluación del desarrollo de las plantas. Estas mediciones fueron: número de hojas, número de raíces, longitud de la hoja mayor, longitud de la raíz mayor y peso fresco.

Se determinó la forma de aplicación del fertilizante, el tipo de fertilizante y la concentración que indujo el mejor desarrollo de las plantas de acuerdo a una prueba de comparación de medias de Tukey con el programa estadístico STATGRAPHICS Plus 5.0.

RESULTADOS

ONTOGÉNIA DE *Laelia autumnalis*

Ruta morfogénica

Se estableció que el desarrollo ontogénico (Tabla 1) desde la siembra hasta la formación de una planta completa mediante el cultivo y germinación asimbiótica *in vitro* tarda 100 días, ya que a este tiempo se presenta la aparición de hojas y raíces verdaderas (Estado 7). La aparición del último estado (12) se dió alrededor de los 133 días. Esto, únicamente para semillas germinadas bajo el filtro color Rojo.

Tabla 1. Estados ontogénicos establecidos en el proceso de germinación y desarrollo de *Laelia autumnalis*.

Número de estado	Estados ontogénicos	Descripción
0	S	Semilla
1	H	Hinchamiento del embrión
2	ST	Embrión sin testa
3	P	Protocormo
4	R	Protocormo con rizoides
5	PF	Protocormo con primordio foliar
6	2PF	Protocormo con dos primordios foliares
7	2G1P	Plántula con dos hojas grandes y una pequeña
8	2G1P RV	Plántula con dos hojas grandes, una pequeña y raíz verdadera
9	3G1P	Plántula con tres hojas grandes y una pequeña.
10	3G1P RV	Plántula con tres hojas grandes, una pequeña y raíz verdadera
11	4G1P RV	Plántula con cuatro hojas grandes, una pequeña y raíz verdadera
12	5G1P RV	Plántula con cinco hojas grandes, una pequeña y raíz verdadera

A los 100 días se establecieron 9 estadios ontogénicos iniciales, que comprenden desde la semilla hasta la formación de una planta completa (aparición de hojas y raíces verdaderas). Se determinaron 4 estados posteriores (3G1P, 3G1P RV, 4G1P RV y 5G1P RV) que reflejan el crecimiento y desarrollo *in vitro* de la planta.

Estado 0. Semilla

Estado inicial en el cual la semilla proviene del fruto y tiene una forma alargada con los extremos redondeados, testa de color beige y translúcida que deja entrever el embrión de forma ovoide color café claro, localizado en la parte central, ocupando un 30% de espacio dentro de la semilla.

Estado 1. Embrión hinchado

Entre los 5 y 10 días posteriores a la fecha de siembra, el embrión presenta un aumento de tamaño y volumen, la tonalidad se torna un poco blanquecina (2.5 GY 8/2 Tablas Munsell), y este aumento de tamaño genera que el embrión presione el tejido de la testa.

Estado 2. Embrión sin testa

Se presenta la ruptura de la testa debido al aumento de volumen del embrión por la imbibición. El embrión se desprende de la testa quedando aislado, esto sucedió entre los 10 y 15 días posteriores a la siembra, presentándose este fenómeno durante 15 días más.

Estado 3. Protocormo

Continúa el crecimiento del embrión modificando su morfología dando origen al protocormo, el cual presenta forma oval, con una epidermis lisa color verde 5GY 4/8 Tablas Munsell (a excepción del tratamiento con ausencia de luz el cual presenta un protocormo incoloro). Esta estructura tuvo lugar entre los 20 y 30 días.

Estado 4 Protocormo con rizoides

El protocormo con rizoides presenta una forma ovoide con la superficie lisa de color verde (protocormos clorofílicos). Presentaba, sobre la superficie media, protuberancias y rizoides rectos y simples, éstos cubrían parte de la superficie. Nuevamente los protocormos se mantenían blanquecinos (2.5 GY 8/2 Tablas Munsell) en el tratamiento sin presencia de luz (protocormos cloróticos). Este estado a los 30 días a partir de la siembra de las semillas y tuvo una duración de aproximadamente 15 días.

Estado 5. Protocormo con primordio foliar

Los protocormos clorofílicos aún ovoides, originaron un primordio foliar en la región apical, este primordio presentaba una coloración verde (5GY 4/8 Tablas Munsell). A su vez se mantuvo la presencia de rizoides en la región media del protocormo. Dicho estadio permaneció durante los 30 y 45 días de cultivo.

Estado 6. Protocormo con dos primordios foliares

Posterior a la aparición del primordio foliar, aparece un segundo primordio de características similares pero de manera opuesta, sobre la misma región apical del protocormo. Se presentó a los 45 días y permaneció hasta los 67 días de manera dominante.

Estado 7 Plántula con dos hojas grandes y una pequeña basal

A partir de la aparición de los primordios foliares, comenzó el desarrollo de las hojas, dichos primordios se elongaron y posterior al crecimiento se presentó una nueva hoja en la base del protocormo. Aparecieron estas primeras hojas a los 60 días y duró así hasta los 90 días.

Estado 8. Plántula con dos hojas grandes y una pequeña basal con raíz verdadera.

Al igual que el estado anterior, dichas plántulas presentan raíz verdadera, que es fotosintéticamente activa, el protocormo cambia de consistencia a una un poco mas rígida dando lugar al pseudobulbo. A partir de esta fecha la plántula se considera completa. Este estado se presento a los 90 días y continuó hasta el fin de la prueba (130 días).

Estado 9. Plántula con tres hojas grandes y una pequeña basal.

La plántula desarrollo nuevas hojas, éstas se elongaron y se presentó una nueva hoja en la base del pseudobulbo. Aparecieron estas primeras hojas entre los 100 días y 110 días.

Estado 10. Plántula con tres hojas grandes y una pequeña basal con raíz verdadera.

En esta etapa de desarrollo, se da un incremento en hojas y un elongamiento de la raíz, permitiendo alcanzar longitudes de hasta 1 centímetro. A lo largo de esta etapa no se registra la aparición de nuevas estructuras, ya que únicamente la plántula comienza su crecimiento y continúa solamente la brotación de hojas y raíces.

Estado 11. Plántula con cuatro hojas grandes y una pequeña basal con raíz verdadera.

Nuevamente se da un incremento en hojas y un elongamiento de la raíz, permitiendo alcanzar longitudes de mas de 1 centímetro. No se registra la aparición de nuevas estructuras, ya que únicamente la plántula comienza su crecimiento y continúa solamente la brotación de hojas y raíces.

Estado 12. Plántula con cinco hojas grandes y una pequeña basal con raíz verdadera.

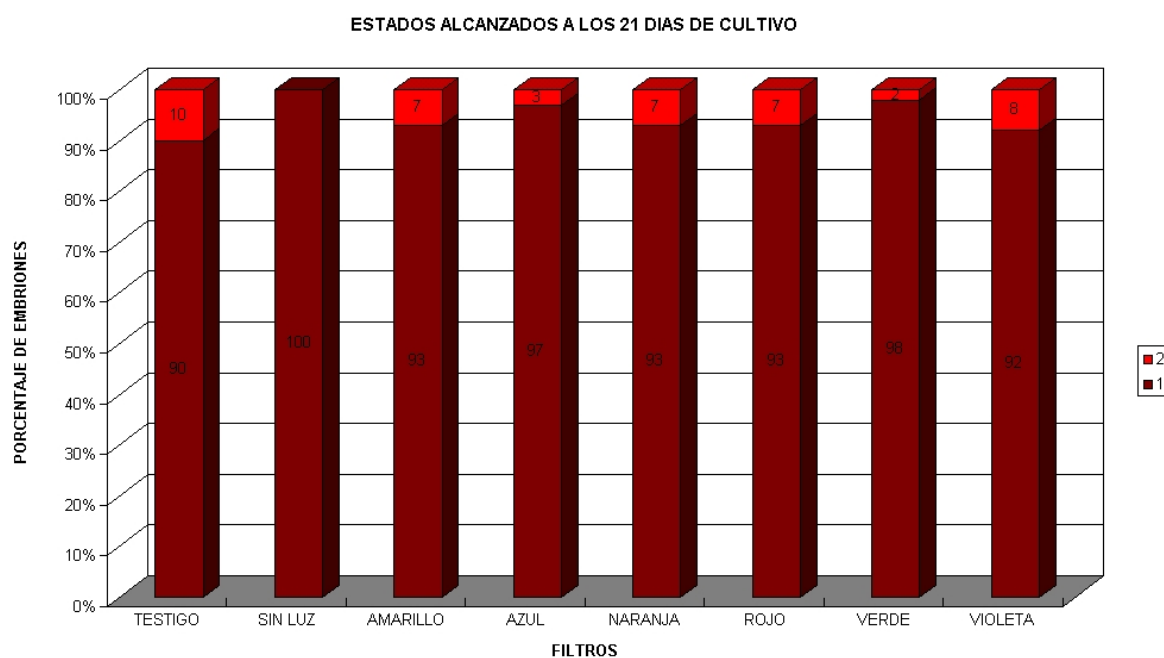
Estado final con una cantidad determinada de hojas, un incremento en el número y elongamiento de la raíz, permitiendo alcanzar longitudes superiores a 1 centímetro.

EFFECTO DE LA LUZ FILTRADA EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE *Laelia autumnalis*.

Para el análisis de las plántulas bajo filtración, se tomaron los siguientes estados ontogénicos descritos anteriormente. (Tabla 2):

Tabla 2. Estados ontogénicos establecidos para la evaluación de las pruebas del efecto de la filtración de luz en el proceso de germinación y desarrollo.

Número de estado	Estados ontogénicos	Color de referencia	Descripción
0	S		Semilla
1	H		Hinchamiento del embrión
2	ST		Embrión sin testa
3	P		Protocormo
4	R		Protocormo con rizoides
5	PF		Protocormo con primordio foliar
6	2PF		Protocormo con dos primordios foliares
7	2G1P		Plántula con dos hojas grandes y una pequeña
8	2G1P RV		Plántula con dos hojas grandes, una pequeña y raíz verdadera
9	3G1P		Plántula con tres hojas grandes y una pequeña.
10	3G1P RV		Plántula con tres hojas grandes, una pequeña y raíz verdadera
11	4G1P RV		Plántula con cuatro hojas grandes, una pequeña y raíz verdadera
12	5G1P RV		Plántula con cinco hojas grandes, una pequeña y raíz verdadera



Gráfica 1. Estados alcanzados a las 3 semanas de ser sembradas las semillas bajo luz filtrada. [(1) Hinchamiento del embrión (2) Embrión sin testa]

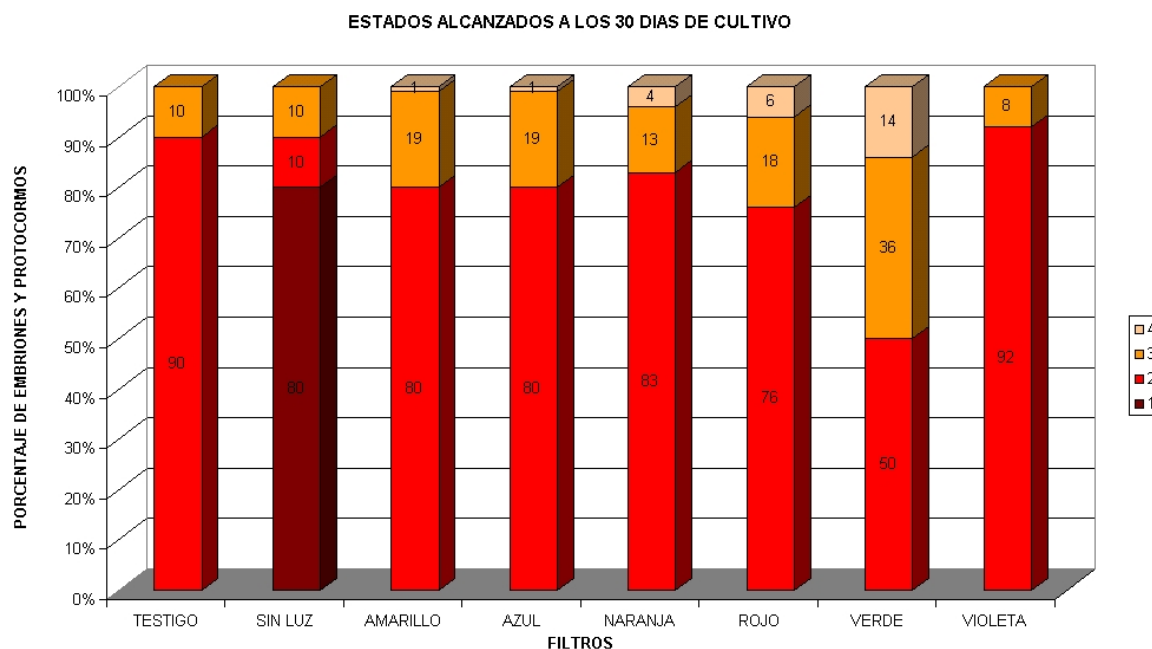
Las primeras tres semanas después de la siembra de las semillas, se observó que los embriones se encontraban hinchados y sólo en algunos se evidenciaba la ruptura de la testa, únicamente los embriones en el tratamiento sin luz permanecieron en Estado 1 (Gráfica 1). Bajo los filtros violeta, naranja, amarillo, rojo, así como el testigo, se dio una respuesta mayor en el cambio de estado, en cambio, las semillas bajo luz azul, y verde solamente algunas pasaron al segundo estado y el grupo sin luz se mantuvo en el primer estado.

A los primeros treinta días de cultivo algunos embriones habían alcanzado el estado 4 (Protocormo con rizoides), esto se presentó bajo el efecto de la luz filtrada amarilla, azul, naranja y verde, por otra parte, los tratamientos sin luz, testigo y violeta permanecieron aún en el estado 3 (Gráfica 2).

Tabla 3. Índice de desarrollo a los 30 días.

	TESTIGO	SIN LUZ	AMARILLO	AZUL	NARANJA	ROJO	VERDE	VIOLETA
H		80.0						
ST	194.1	20.0	159.5	160.4	165.2	151.0	100.8	184.3
P	35.3	30.0	57.0	56.6	39.1	55.1	108.3	23.5
R			5.1	3.8	17.4	24.5	54.1	

(El número azul indica el filtro con mayor índice de desarrollo, el rojo, el filtro con menos desarrollo y en verde, el estado predominante del tratamiento) [(H) Hinchamiento del embrión (ST) Embrión sin testa (P) Protocormo (R) Protocormo con rizoides]



Gráfica 2. Estados alcanzados a los 30 días de ser sembradas las semillas. [(1) Hinchamiento del embrión (2) Embrión sin testa (3) Protocormo (4) Protocormo con rizoides]

Entre los treinta y cuarenta días se observó en el protocormo la aparición del primer primordio foliar y una semana después, la aparición del segundo

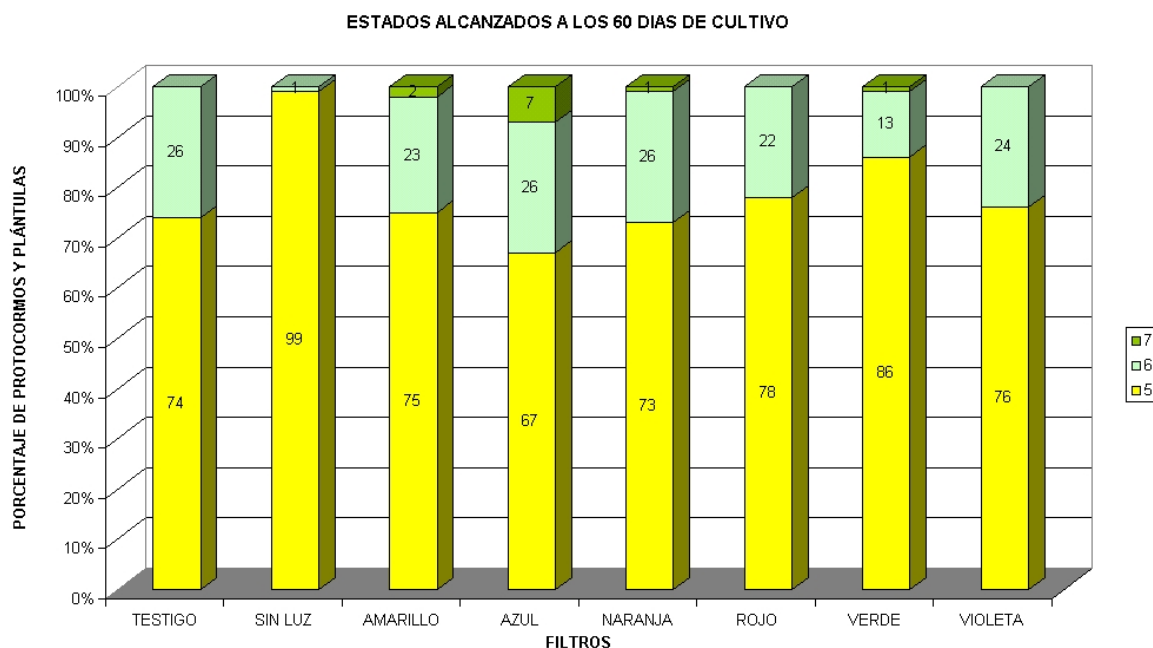
primordio foliar. A pesar de haber tenido una respuesta lenta los primeros días, en esta etapa el filtro verde presentó la mayor respuesta al desarrollo de nuevas estructuras llegando al estado 4, mientras que el grupo testigo y las semillas bajo filtro violeta únicamente presentaron cambio de estado al número 3 (Tabla 3). Ya para los 60 días los tratamientos presentaban tres hojas, dos de tamaño mayor y una pequeña. En esta etapa las plántulas con estas características se presentaron en los filtros amarillo, naranja, verde y azul, siendo éste último el lote que mostraba el mayor índice de desarrollo (Tabla 4). Los filtros restantes así como el testigo y el lote en ausencia de luz se encontraban aun en el estado donde los protocormos aun presentaban sólo dos primordios foliares (Gráfica 3).

Tabla 4. Índice de desarrollo a los 60 días.

	TESTIGO	SIN LUZ	AMARILLO	AZUL	NARANJA	ROJO	VERDE	VIOLETA
PF	372.1	497.0	377.1	336.5	366.7	391.5	426.8	379.0
2PF	153.5	3.6	140.6	155.8	155.6	130.2	80.4	145.2
2G1P			8.0	47.1	5.2		8.7	

(El número azul indica el filtro con mayor índice de desarrollo, el rojo, el filtro con menos desarrollo y en verde, el estado predominante del tratamiento) [(PF) Embrión con un primordio foliar, (2PF) Embrión con dos primordios foliares (2G1P) Plántula con dos hojas grandes y una pequeña basal]

El tratamiento sin luz registró un mayor porcentaje de protocormos en estado 5, esto a su vez arrojó un menor índice de desarrollo (Tabla 4). Este tratamiento mostró un crecimiento diferente a los demás filtros ya que presentó una coloración blanquecina (2.5 GY 8/2 Tablas Munsell) en sus estructuras, así como elongamiento de tallo y el acortamiento de los primordios foliares (Gráfica 3).



Gráfica 3. Estados alcanzados a los 60 días de ser sembradas las semillas. [(5) Embrión con un primordio foliar, (6) Embrión con dos primordios foliares (7) Plántula con dos hojas grandes y una pequeña basal]

Hugo Jesús Sierra Jiménez

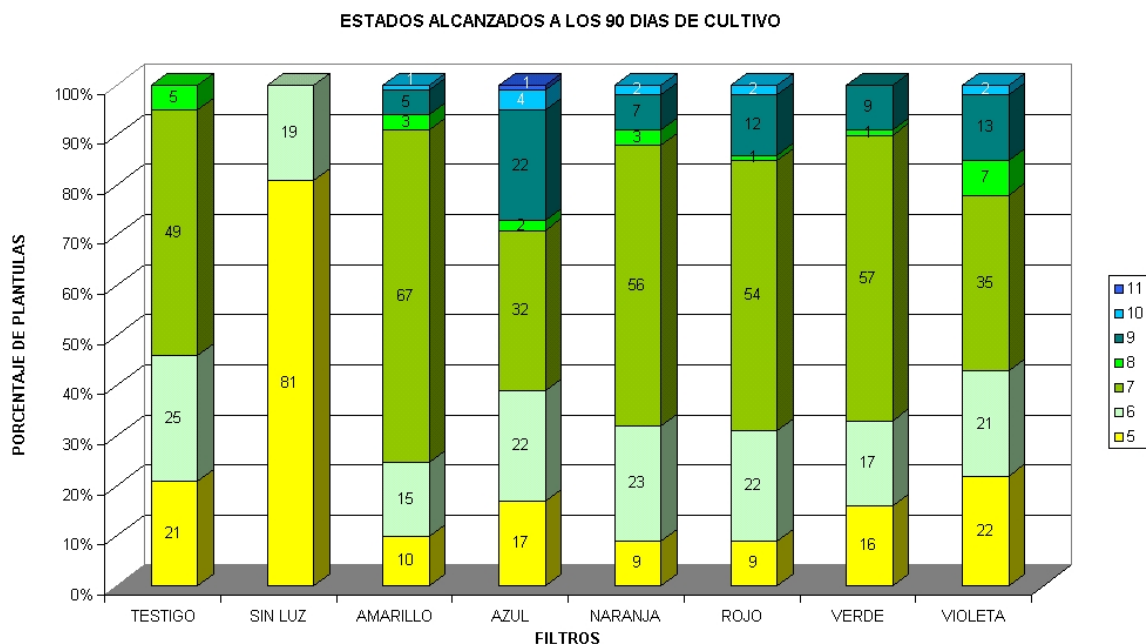
La cuantificación de los resultados a partir de los 60 días de incubación se realizó tomando como criterio base la aparición de primordios foliares y desarrollo de las hojas en los protocormos debido a la gran cantidad de semillas a evaluar.

A los 90 días de cultivo, sólo las plántulas sometidas a iluminación con filtro de luz azul alcanzaron el estado 11, los tratamientos con filtros amarillo, naranja, rojo y violeta permanecieron en el estado 10, mientras que los demás tratamientos se mantuvieron por debajo de estos (Gráfica 4).

Tabla 5. Índice de desarrollo a los 90 días.

	TESTIGO	SIN LUZ	AMARILLO	AZUL	NARANJA	ROJO	VERDE	VIOLETA
PF	103.8	405.7	47.9	84.2	45.7	46.2	79.9	110.0
2PF	147.2	113.2	87.4	132.6	135.6	131.4	101.8	124.0
2G1P	343.4		469.3	224.7	390.4	384.2	405.9	252.0
2G1P RV	45.3		24.5	16.8	26.9	6.3	1.6	53.3
3G1P			41.4	198.9	64.9	104.5	79.9	114.0
3G1P RV			11.5	42.1	19.2	15.8		20.0
4G1P RV				5.8				

(El número azul indica el filtro con mayor índice de desarrollo, el rojo, el filtro con menos desarrollo y en verde, el estado predominante del tratamiento) [(PF) Embrión con un primordio foliar, (2PF) Embrión con dos primordios foliares, (2G1P) Plántula con dos hojas grandes y una pequeña basal, (2G1P RV) Plántula con dos hojas grandes, una pequeña basal y raíz verdadera, (3G1P) Plántula con tres hojas grandes y una pequeña basal, (3G1P RV) Plántula con tres hojas grandes, una pequeña basal y raíz verdadera, (4G1P RV) Plántula con cuatro hojas grandes, una pequeña basal y raíz verdadera]



Gráfica 4. Estadios alcanzados a los 90 días de ser sembradas las semillas. [(5) Embrión con un primordio foliar, (6) Embrión con dos primordios foliares, (7) Plántula con dos hojas grandes y una pequeña basal, (8) Plántula con dos hojas grandes, una pequeña basal y raíz verdadera, (9) Plántula con tres hojas grandes y una pequeña basal, (10) Plántula con tres hojas grandes, una pequeña basal y raíz verdadera, (11) Plántula con cuatro hojas grandes, una pequeña basal y raíz verdadera]

El tratamiento en ausencia de luz (con un índice de desarrollo mas bajo) permaneció en el estado 6, aunque la mayor parte de los protocormos aun se encontraban en el estado 5 (Tabla 5), esto debido a que no se presentó la aparición de hojas u alguna otra estructura que indique un avance en el desarrollo. Los demás tratamientos indujeron los cambios de estado morfológico a diferentes velocidades (Tabla 5). Para todos los filtros excepto el testigo y sin luz, las plántulas se encontraban en mayor proporción sin raíz, ya que mas del 50% de sus individuos se encontraban en los estados 7 y 9 (Tabla 5). Por otro lado solamente un pequeño porcentaje en todos los filtros presentaban plántulas con 3 o 4 hojas (dos o tres hojas de mayor tamaño y una mas pequeña) y raíz verdadera y sólo el filtro azul alcanzó un estado mas avanzado con 5 hojas (cuatro hojas de mayor tamaño y una mas pequeña) con raíz verdadera. Cabe destacar que el filtro azul fue el tratamiento en el que se presentó una mayor variedad de estados al mismo tiempo, como son el 5,6,7,8,9,10 y 11 (Gráfica 4).

En caso contrario el tratamiento con ausencia de luz sólo se presentaron dos estados simultáneamente (5 y 6) y bajo luz no filtrada (testigo) también es baja la diversidad de estadios simultáneos presentándose sólo cuatro (5, 6, 7 y 8) al mismo tiempo (Gráfica 4).

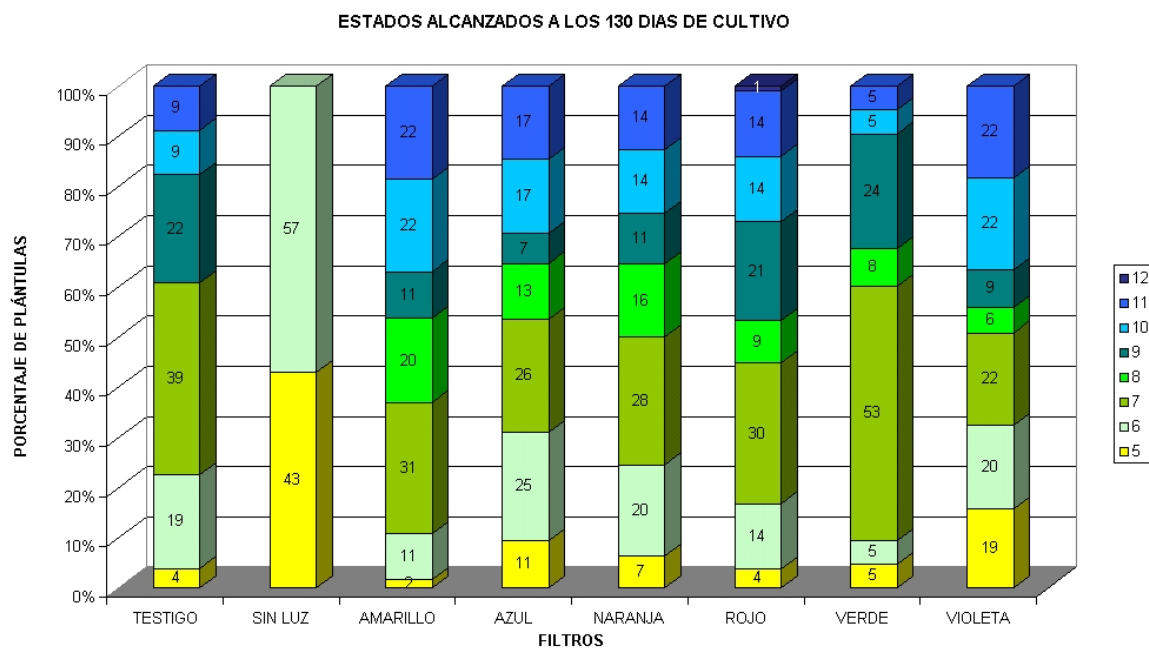
Esto es muy importante ya que indica que la filtración de la luz acelera el desarrollo bajo cualquier tipo de filtro. La luz sin filtrar como la ausencia de la misma inhibe el desarrollo.

Al los 130 días de cultivo, únicamente el tratamiento con filtro rojo alcanzó el estado morfológico más avanzado (Estado 12). Las plántulas de este filtro rebasaron la velocidad del efecto del filtro azul (a los 90 días), ya que si bien las plántulas de este último alcanzaron el estado 11 más rápido que las sometidas al filtro rojo a los 90 días, los individuos bajo el filtro rojo pasaron del estadio 11 al 12 con mayor velocidad, mientras que en el filtro azul aún no se alcanzaba todavía el estado 12 a los 130 días (Tabla 5 y 6). Por otro lado los tratamientos con los filtros restantes y el grupo testigo se mantuvieron en el estadio 11, mientras que el tratamiento en ausencia de luz registró de nueva cuenta el menor índice de desarrollo (Tabla 6) y mayoritariamente presentó individuos en el estadio 6, estas plántulas presentaron primordios foliares alargados y con los ápices en una tonalidad verdosa (5GY 4/8 Tablas Munsell) que se fue degradando hasta llegar a su tonalidad blanquecina (2.5 GY 8/2 Tablas Munsell) (Gráfica 5).

Es evidente que la ausencia de luz inhibe el proceso de desarrollo ya que no permite el desarrollo del embrión y por lo tanto evita o retarda la formación de plantas completas.

Es importante señalar que el efecto retardante o inhibitorio que tuvo la luz no filtrada hasta los 90 días fue desactivado o sobrepuesto ya que a los 130 días la respuesta de germinación y desarrollo igualó a la de los demás tratamientos con luz filtrada.

De manera general, todos los tratamientos indujeron el cambio o transferencia de un estado ontogénico a otro en mayor o menor medida ya que la mayoría de los individuos que estuvieron en los estados 5,6,7,8,9,10 y 11 a los 90 días pasaron al siguiente nivel a los 130 días de iniciado el estudio.



Grafica 5. Estados alcanzados a los 130 días de incubación bajo tratamientos lumínicos. [(5)

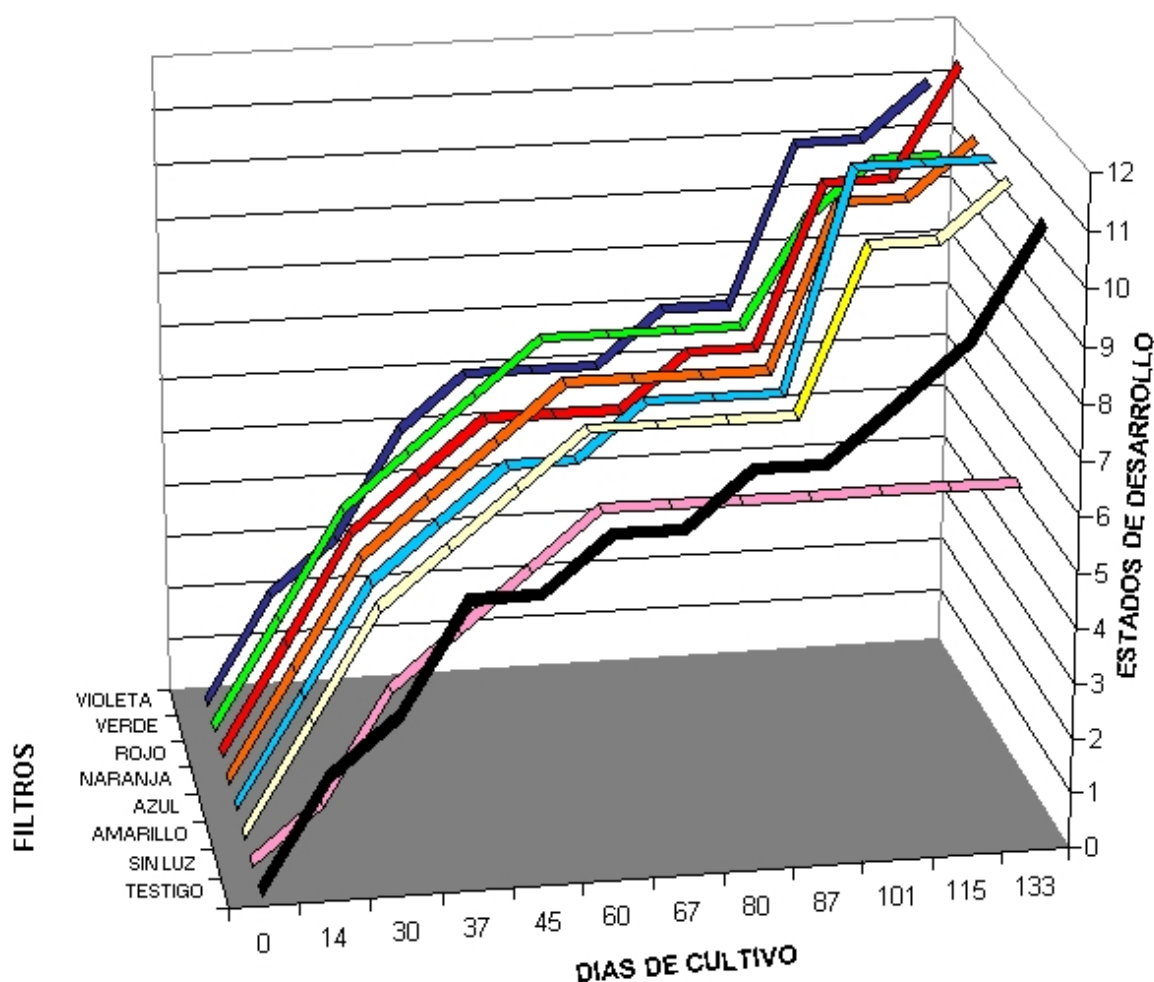
Embrión con un primordio foliar, (6) Embrión con dos primordios foliares, (7) Plántula con dos hojas grandes y una pequeña basal, (8) Plántula con dos hojas grandes, una pequeña basal y raíz verdadera, (9) Plántula con tres hojas grandes y una pequeña basal, (10) Plántula con tres hojas grandes, una pequeña basal y raíz verdadera, (11) Plántula con cuatro hojas grandes, una pequeña basal y raíz verdadera, (12) Plántula con cuatro hojas grandes, una pequeña basal y raíz verdadera]

Tabla 6. Índice de desarrollo a los 130 días.

	TESTIGO	SIN LUZ	AMARILLO	AZUL	NARANJA	ROJO	VERDE	VIOLETA
PF	18.5	215.4	9.6	56.5	37.2	21.7	24.6	93.6
2PF	111.1	33.8	63.2	147.6	121.3	83.2	28.2	121.9
2G1P	272.2		217.7	183.5	197.3	214.5	371.1	153.5
2G1P RV			172.2	103.2	127.7	71.7	66.2	47.1
3G1P	200.0		94.7	65.3	100.5	195.1	215.4	77.0
3G1P RV	92.6		215.3	165.3	143.6	135.8	51.5	224.6
4G1P RV	81.5		31.6	13.3	29.3	73.1		23.5
5G1P RV						3.5		

(El número azul indica el filtro con mayor índice de desarrollo, el rojo, el filtro con menos desarrollo y en verde, el estado predominante del tratamiento) [(PF) Embrión con un primordio foliar, (2PF) Embrión con dos primordios foliares, (2G1P) Plántula con dos hojas grandes y una pequeña basal, (2G1P RV) Plántula con dos hojas grandes, una pequeña basal y raíz verdadera, (3G1P) Plántula con tres hojas grandes y una pequeña basal, (3G1P RV) Plántula con tres hojas grandes, una pequeña basal y raíz verdadera, (4G1P RV) Plántula con cuatro hojas grandes, una pequeña basal y raíz verdadera (5G1P RV) Plántula con cuatro hojas grandes, una pequeña basal y raíz verdadera]

ESTADOS DE DESARROLLO ALCANZADOS DURANTE EL CULTIVO



Grafica 6. Cambios de estado por tratamiento en relación al tiempo

A lo largo del proceso de germinación y cultivo, se fueron alcanzando estados de acuerdo al filtro empleado. En la Gráfica 6 se muestra el desarrollo que presentaron las orquídeas desde el estado 1 al 12 durante el periodo de prueba.

Las semillas permanecieron muy poco tiempo en el estado 1 y 3 ya que rápidamente pasaron a un estado más avanzado. Regularmente los individuos permanecían aproximadamente entre 8 y 15 días por estado. Esto sucedió hasta los 67 días donde el estado 7 se mantuvo entre los 15 y 20 días. Pasado este periodo de tiempo los cambios de estado fueron drásticos, ya que en menos de 15 días algunos tratamientos rebasaron más de 3 estados.

Durante los primeros 45 días la mayoría de los tratamientos se establecieron en el estado 6 a excepción de los tratamientos sin filtro y sin luz, los cuales aun permanecieron en el estado 5. A los 60 días solo 3 tratamientos

(amarillo, naranja y verde) presentaron individuos en el siguiente estado, aunque estos permanecieron así hasta los 87 días donde ya todos los filtros y el testigo también presentaban individuos en el estado 7. Los días subsecuentes, el filtro azul presentó un mayor cambio de estado, al pasar del estado 7 al 11 en 14 días mientras que los demás filtros se encontraban en los estados 8, 9 y 10, a excepción del tratamiento sin luz, el cual permaneció en el estado 6 desde los 60 días y hasta el término de la prueba. Al final sólo el filtro rojo alcanzó el estado 12 en sólo 18 días después de haber permanecido en el estado 10. Todos los filtros restantes presentaban plántulas en estado 11 a excepción del filtro verde, el cual presentó plántulas en estado 10.

En la grafica 6, se puede observar que el estado 7 fue donde las plántulas requirieron de mas tiempo para llegar al estado 8, donde se encuentra la aparición de raíces. Los estados de permanencia mas corta fueron los iniciales (1-3) y los finales (7-12).

Al inicio de la prueba, el filtro verde promovió un desarrollo mas rápido hasta llegar al estado 7. En caso contrario, el testigo, el filtro rojo y principalmente el tratamiento en ausencia de luz retardó el desarrollo de los individuos igualmente al llegar al estado 7. Posteriormente, a partir del estado 7 y hasta el fin de la prueba, las plántulas bajo el filtro azul y rojo favorecieron rápidamente el cambio de estado. Mientras que las que se encontraban bajo filtro verde y sin luz, retardaron el cambio de estado, al llegar únicamente al estado 10 y 6 respectivamente.

En resumen al inicio de la prueba el filtro verde fue uno de los promotores de la germinación hasta los 60 días, posteriormente el filtro azul y rojo, favorecieron la aceleración en el desarrollo de las plántulas hasta el fin de la prueba.

Aunque no fue inhibida la germinación, en el tratamiento sin luz sí se retardó su crecimiento y el tiempo en que cambió de un estado a otro.

EFFECTO DEL ESTÍMULO LUMÍNICO EN LA PIGMENTACIÓN FOLIAR DE PLÁNTULAS *IN VITRO*

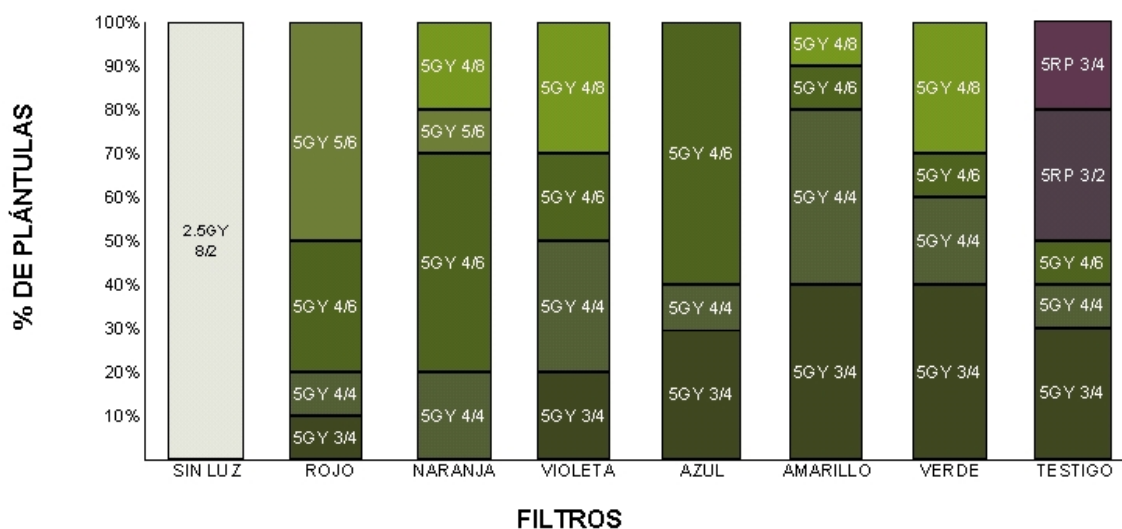
La obtención de plántulas germinadas *in vitro* permitió el análisis de su coloración foliar para determinar las diferencias existentes en respuesta a la filtración de la luz a la cual fueron sometidas (Tabla 7).

Tabla 7. Intensidad lumínica transmitida por la filtración de cada color y el testigo.

	FILTROS						
	TESTIGO	AMARILLO	AZUL	NARANJA	ROJO	VERDE	VIOLETA
ILUMINACIÓN	656	474	398	527	301	226	441
%	100	72.25	60.67	80.33	45.88	34.45	67.22

(El número en azul indica la mayor iluminación permitida por un filtro el número rojo indica la menor iluminación permitida por un filtro) (Las unidades de intensidad son reportadas en Lux)

Para este análisis se emplearon “Tablas Colorimétricas de Tejidos Vegetales Munsell®”, de las cuales se obtuvieron las siguientes tonalidades de la lámina foliar en los tratamientos experimentales:



Gráfica 7. Tonalidad (H V/C) registrada en la lámina foliar de plantas germinadas *in vitro* en respuesta a los diferentes filtros de luz.

En la Gráfica 7 se muestran las tonalidades que presentaron las hojas de las plántulas en respuesta a los tratamientos lumínicos experimentales, destacándose la pigmentación del tratamiento en ausencia de luz el cual presentó una tonalidad blanco-grisáceo (2.5GY 8/2), a diferencia del grupo testigo que recibió iluminación sin filtrar y que muestra tonalidades violáceas (5RP 3/4 y 5RP 3/2) en más del 50% de las plántulas analizadas. Aquí también se puede observar que aunque en diferentes proporciones, los tratamientos con filtros verde, amarillo y violeta (5GY 4/8, 5GY 4/6, 5GY 4/4 y 5GY 3/4) presentan las mismas

Hugo Jesús Sierra Jiménez

tonalidades aunque en diferentes proporciones. Mientras los otros tratamientos experimentales difieren en al menos uno de los tonos obtenidos.

COMPOSICIÓN PIGMENTARIA DE LAS HOJAS DE *Laelia autumnalis*.

Una vez obtenidos los resultados de la secuencia de estadíos y la tonalidad foliar de las plántulas de *Laelia autumnalis*, se realizaron extracciones de pigmentos los cuales fueron cuantificados en un espectrofotómetro de absorción, de dichas lecturas se obtuvieron los resultados presentados en la Tabla 8.

Al graficar se estableció que la mayor absorbancia la presentó el grupo testigo a los 425nm, mientras que la menor la presentó el lote que permaneció bajo oscuridad en los 625nm. Cabe destacar que en las plántulas bajo el filtro amarillo, tuvo un comportamiento irregular, ya que algunas de las absorbancias coincidían con los valores de los filtros rojo y verde, a diferencia de los demás tratamientos que mantuvieron cierta tendencia proporcional paralela a los otros filtros analizados.

Tabla 8. Absorbancias de los extractos de pigmentos de las hojas de las plantas sometidas a la iluminación filtrada

nm	FILTROS							
	TESTIGO	AZUL	VERDE	ROJO	AMARILLO	NARANJA	VIOLETA	SIN LUZ
420	1.600	1.400	1.080	1.130	1.080	0.835	0.930	0.400
425	1.640	1.460	1.120	1.180	1.150	0.895	0.985	0.042
435	1.600	1.440	1.090	1.160	1.160	0.885	0.970	0.046
440	1.540	1.370	1.035	1.100	1.100	0.835	0.915	0.041
445	1.460	1.300	0.975	1.030	1.020	0.780	0.850	0.040
450	1.400	1.230	0.930	0.965	0.970	0.728	0.796	0.036
470	0.985	0.890	0.668	0.710	0.692	0.504	0.566	0.029
475	0.805	0.736	0.556	0.576	0.566	0.414	0.464	0.021
480	0.658	0.586	0.452	0.474	0.452	0.321	0.378	0.019
625	0.262	0.233	0.164	0.183	0.177	0.115	0.157	0.006
643	0.426	0.390	0.271	0.300	0.307	0.214	0.258	0.012
660	0.762	0.652	0.470	0.514	0.532	0.402	0.444	0.021
690	0.082	0.079	0.071	0.075	0.060	0.030	0.067	0.003

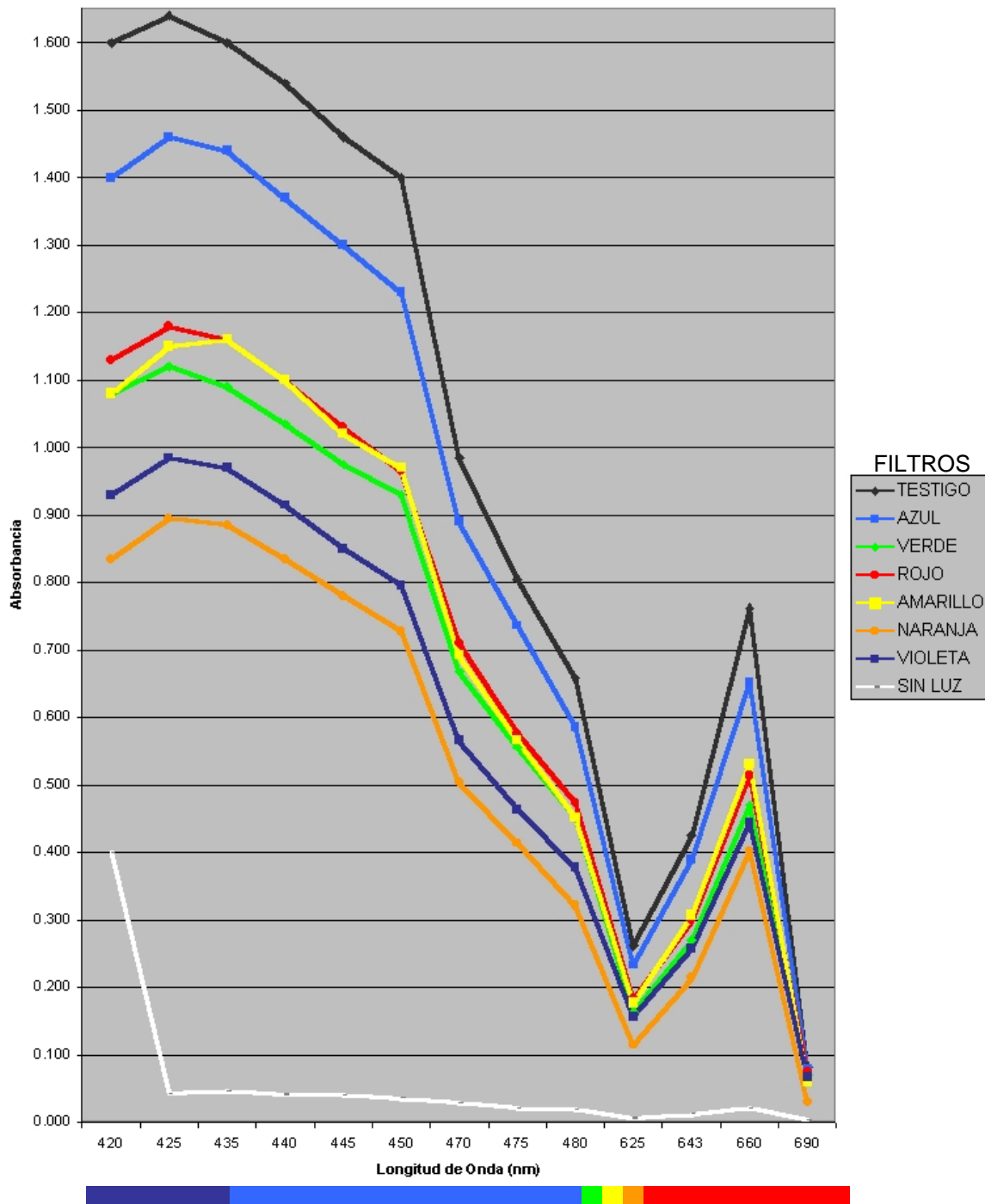
nm=Nanómetros. (Valor mas alto, Segundo valor mas alto, Valor mas bajo y Segundo valor mas bajo) .

Estos datos coinciden con la intensidad en la variación de tonos de las plántulas analizadas con las tablas Munsell, donde los tonos mas intensos los presenta el grupo Testigo, seguido del azul, rojo, amarillo, verde, violeta, naranja y por ultimo el tratamiento sin luz (Gráfica 8).

A su vez al comparar las absorbancias de los pigmentos de las plántulas experimentales con la absorbancia patrón de pigmentos se pueden encontrar en ciertas longitudes de onda algunos pigmentos presentes como son: α -caroteno, Clorofila a, β -caroteno, Violaxantol, Luteol y Clorofila b. (Gráfica 9)

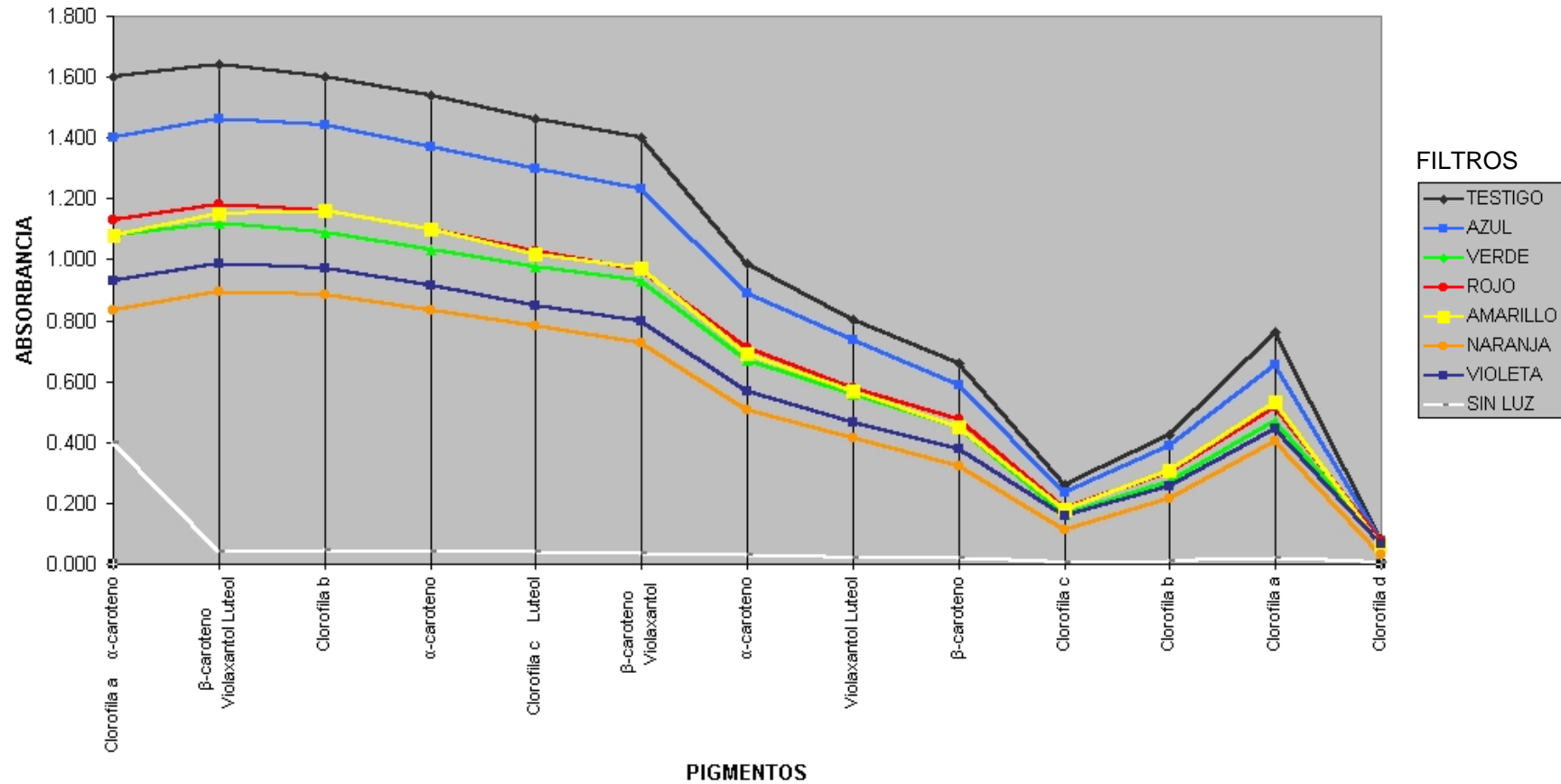
Las mayores absorbancias fueron registradas en las plántulas testigo, mientras que la menor absorbancia se registró en plántulas sin luz. Generalmente la tendencia de las lecturas fue similar entre los tratamientos bajo los filtros.

Lectura de Pigmentos



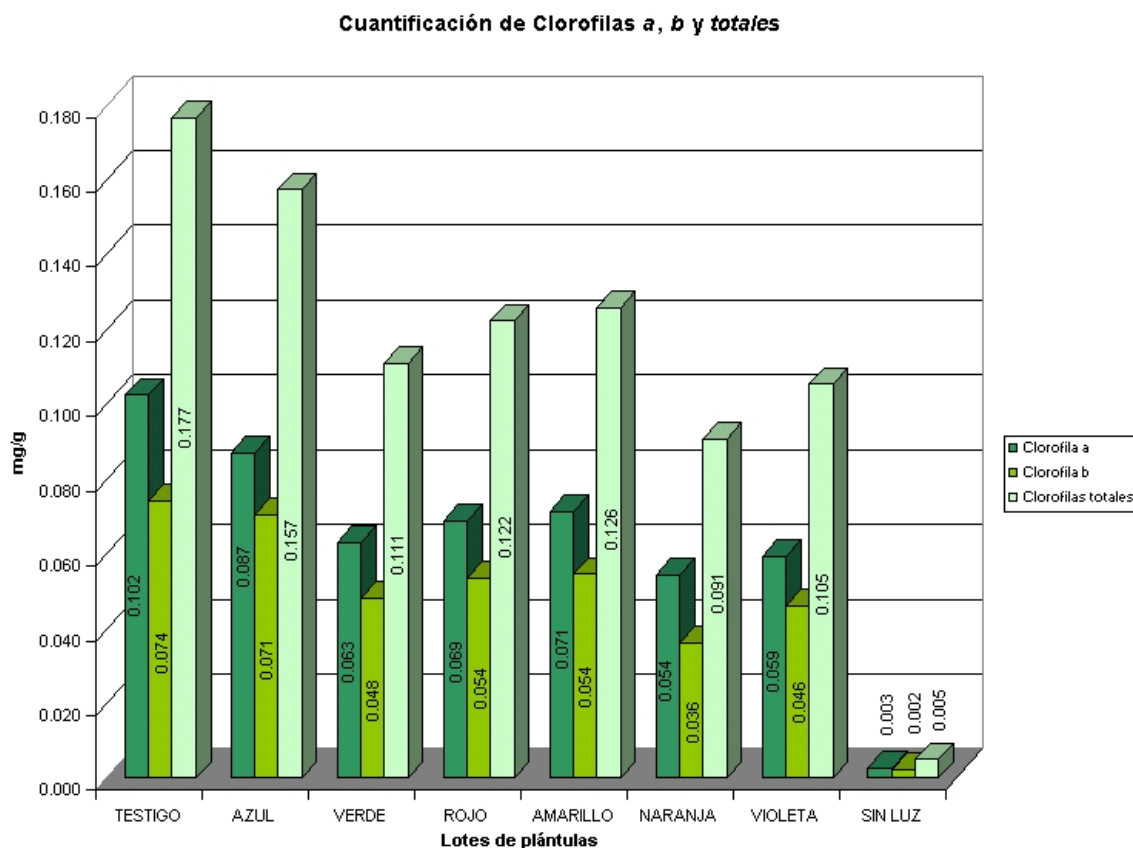
Gráfica 8. Absorbancias de los pigmento presentes en las hojas sujetas al estímulo de diferentes filtraciones lumínicas.

PRESENCIA Y LECTURA DE PIGMENTOS A DIFERENTES LONGITUDES DE ONDA



Grafica 9. Pigmentos que se encontraron presentes en la lámina foliar de acuerdo a las diferentes longitudes de onda.

Con base en los resultados de la evaluación de la absorbancia de los pigmentos fotosintéticos (clorofila a, b y c) provenientes de los diferentes tratamientos lumínicos, se cuantificaron las concentraciones clorofílicas (miligramos por gramo de peso). La Gráfica 10 muestra las concentraciones en *mg/g* de las clorofilas a, b y totales:



Gráfica 10. Concentración en *mg/g* de las clorofilas a, b y totales en los extractos provenientes de las hojas de plantas sujetas a la iluminación con luz filtrada.

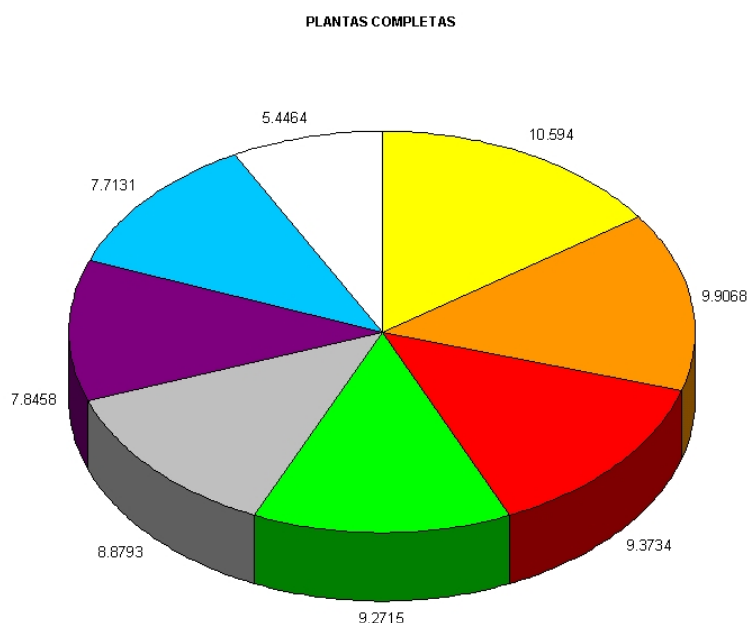
La mayor concentración de clorofilas (clorofila a = 0.102 *mg/g*, clorofila b = 0.074 *mg/g* y clorofilas totales= 0.177 *mg/g*) se presentó en el grupo testigo el cual recibió el estímulo de la iluminación no filtrada. La menor cantidad de clorofilas se encontró, en el tratamiento que no recibió el estímulo lumínico, donde se presentan valores muy pequeños en relación al testigo y al resto de los demás tratamientos.

Los filtros azul y amarillo fueron los más productivos después del testigo, y en contraparte la menor producción de clorofila fue registrada por la filtración con luz naranja.

BIOMASA DE LAS PLANTAS OBTENIDAS *IN VITRO*.

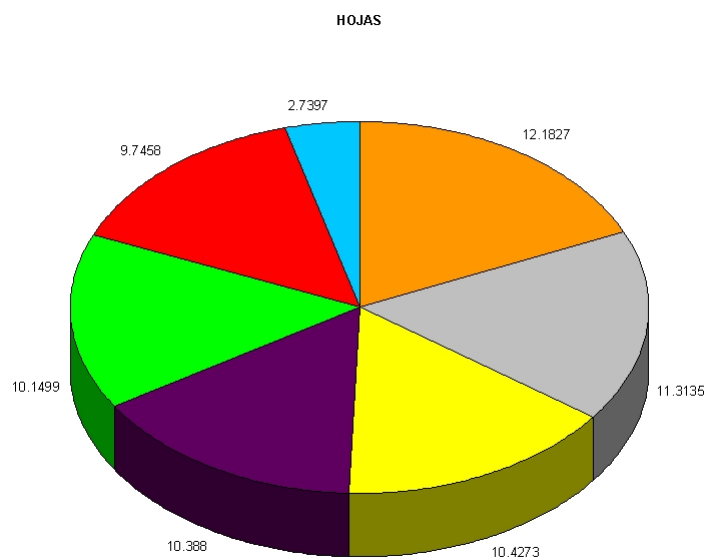
Se hace la aclaración de que, en el caso del tratamiento en ausencia de luz únicamente se realizó el análisis como planta completa, ya que para los análisis de hoja y raíz, las plántulas no presentaban láminas foliares bien delimitadas así como presencia de raíces. (Tabla 9)

En cuanto a las plantas completas el mayor porcentaje de biomasa respecto al peso fresco lo obtuvo el tratamiento bajo filtro amarillo con un 10.6%, seguido del naranja y el rojo con 9.9% y 9.3% respectivamente. El tratamiento que obtuvo la menos producción de biomasa en planta completa fue en ausencia de luz con sólo el 5.44% (Gráfica 11).



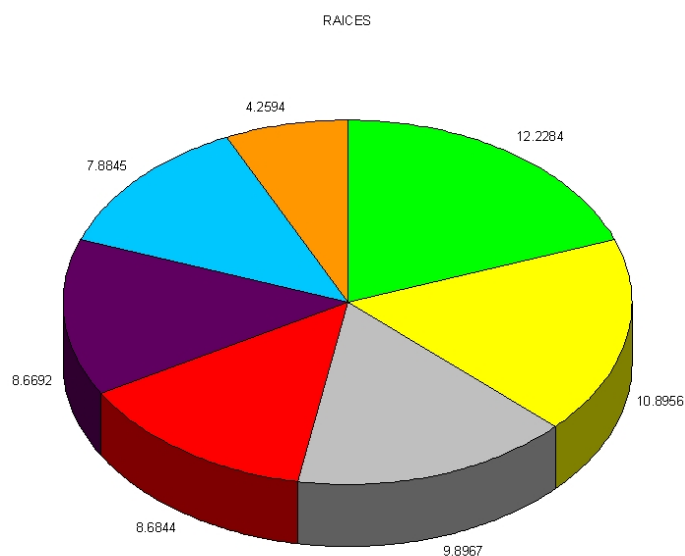
Gráfica 11. Porcentaje de biomasa de plantas completas de *Laelia autumnalis* de acuerdo al color del filtro.

En la cuantificación de biomasa foliar tenemos que el filtro naranja registró el mayor peso seco con un 12.18%, casi 1% por encima del grupo testigo, el cual obtuvo un 11.31%. La menor producción se encontró en el filtro azul con un 2.73% (Tabla 9 y Gráfica 12) .



Gráfica 12. Porcentaje de biomasa en hojas de *Laelia autumnalis* de acuerdo al color del filtro.

En la producción de biomasa en raíz, las raíces que presentaban las plántulas bajo el tratamiento con filtro Verde tenían longitudes inferiores a los otros tratamientos, lo cual hace suponer que un gran contenido celular se concentró en estas estructuras. Esto, por que al hacer el análisis de peso seco, el filtro verde obtuvo el valor más alto con un 12.22%, lo cual resulta un tanto incierto, debido a las diferencias en relación tamaño-peso. El siguiente valor más alto fue el filtro amarillo, seguido del testigo con un 10.9% y 9.9% respectivamente. El filtro que produjo la menor cantidad de biomasa en raíz fue el naranja con un 4.25% (Tabla 9 y Gráfica 13).



Gráfica 13. Porcentaje de biomasa en raíces de *Laelia autumnalis* de acuerdo al color del filtro.

Como se presentó anteriormente, para el análisis foliar y radical no se evaluó el contenido de biomasa del tratamiento bajo ausencia de luz, ya que la morfología de la planta no permitía diferencias tanto raíces como hojas para hacer su respectivo análisis.

Tabla 9. Biomasa producida en plántulas de los diferentes tratamientos.

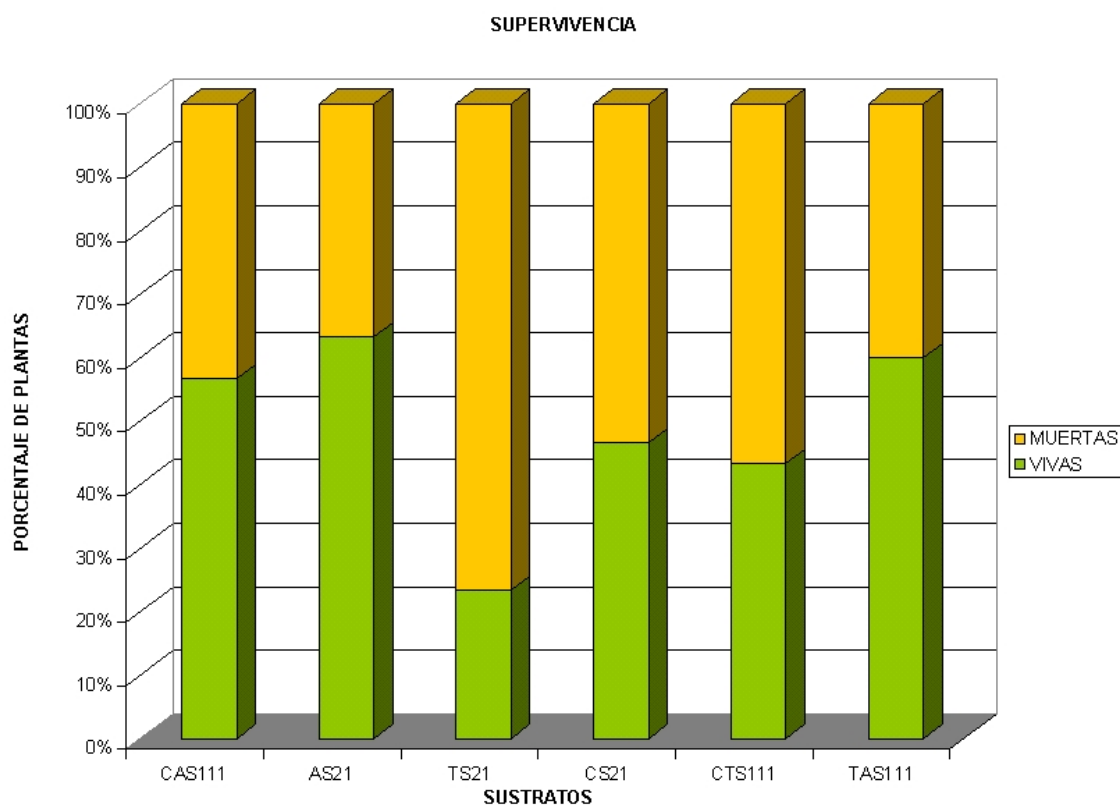
FILTROS	PLANTAS COMPLETAS				HOJAS				RAICES			
	PESO (g)			%	PESO (g)			%	PESO (g)			%
	PESO FRESCO	PESO SECO	DIFERENCIA	PORCENTAJE DE PESO SECO	PESO FRESCO	PESO SECO	DIFERENCIA	PORCENTAJE DE PESO SECO	PESO FRESCO	PESO SECO	DIFERENCIA	PORCENTAJE DE PESO SECO
TESTIGO	1.0226	0.0908	0.9318	8.8793	0.3129	0.0354	0.2775	11.3135	0.5130	0.0508	0.4622	9.8967
SIN LUZ	1.0135	0.0552	0.9583	5.4464	-	-	-	-	-	-	-	-
AMARILLO	0.9949	0.1054	0.8895	10.5940	0.5054	0.0527	0.4527	10.4273	0.5158	0.0562	0.4596	10.8956
AZUL	0.9970	0.0769	0.9201	7.7131	0.5183	0.0142	0.5041	2.7397	0.5162	0.0407	0.4755	7.8845
NARANJA	0.9983	0.0989	0.8994	9.9068	0.5122	0.0624	0.4498	12.1827	0.5003	0.0213	0.4790	4.2574
ROJO	0.9943	0.0932	0.9011	9.3734	0.4997	0.0487	0.4510	9.7458	0.5055	0.0439	0.4616	8.6844
VERDE	0.9966	0.0924	0.9042	9.2715	0.5202	0.0528	0.4674	10.1499	0.1243	0.0152	0.1091	12.2284
VIOLETA	1.0018	0.0786	0.9232	7.8458	0.4226	0.0439	0.3787	10.3880	0.5110	0.0443	0.4667	8.6692

(Los números **azules** muestran los tratamientos con mayor porcentaje de biomasa con respecto al peso fresco. Y los números **rojos** los tratamientos con menor porcentaje de biomasa)

EFFECTO DE LA MEZCLA DE SUSTRATOS EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO *EX VITRO*

ÍNDICE DE SUPERVIVENCIA (IS) DE LAS PLÁNTULAS EN LOS SUSTRATOS

En todos los sustratos hubo pérdida de plántulas. A los 45 días el índice de supervivencia registró entre un 40% y un 86.66%, donde la mezcla AS21 registro la menor perdida y la mezcla TS21 la mayor perdida de plántulas. Al final de la prueba la tendencia se mantuvo y siendo la mezcla de sustratos AS21 el que registró el mayor IS final con un 63.33% y la mezcla de sustratos TS21 el menor IS final de plantas con 23.33% (Tabla 12 y Gráfica 14).



Gráfica 14. Índice de Supervivencia (IS) de plantas vivas después de la aclimatización.

[Mezclas de sustratos: Carbón – Agrolita – Esfagnum 1:1:1 (CAS111), Agrolita – Esfagnum 2:1 (AS21), Tezontle – Esfagnum 2:1 (TS21), Carbón – Esfagnum 2:1 (CS21), Carbón – Tezontle – Esfagnum 1:1:1 (CTS111) y Tezontle – Agrolita – Esfagnum 1:1:1 (TAS111)]

DIFERENCIAS ENTRE LAS MEZCLAS DE SUSTRATOS A LOS 45 DÍAS

En los primeros 45 días, los sustratos AS21 y TAS111 presentaron los valores de media con mayor producción foliar, raíces y peso fresco (Tabla 11 y Gráfica 15 a, b y e), sin embargo, en comparación de los valores al inicio de la prueba, se registró una disminución de hojas en todas las mezclas (Tabla 10 y Gráfica 15 a) y un incremento en la producción de raíces y peso (Tabla 10 y Gráfica 15 b y e). Por otro lado, la mezcla TS21 obtuvo la mayor pérdida tanto de hojas como de raíces (Tabla 10 y Gráfica 15 a y b).

Tabla 10. Efecto de las mezclas de sustratos en las variables analizadas al inicio de la

SUSTRATO	Producción Foliar (#)	Longitud de Hoja (cm)	Producción de Raíces (#)	Longitud de Raíz (cm)	Peso (g)	Supervivencia (%)
AS21	6.43	4.99	4.46	3.82	0.518 ab	100
CS21	6.16	5.06	5.36	3.05	0.508 ab	100
TS21	6.00	5.31	5.56	3.80	0.685 a	100
CAS111	6.00	4.69	4.46	3.06	0.523 ab	100
CTS111	6.03	4.57	4.50	3.33	0.452 b	100
TAS111	5.73	4.91	4.63	3.34	0.543 ab	100

prueba.

(Los números azules indican el valor de la *media* más alta por variable analizada, los números rojos indican el valor de la *media* más bajo por variable analizada, las variables *a* y *b* indican las diferencias entre medias)

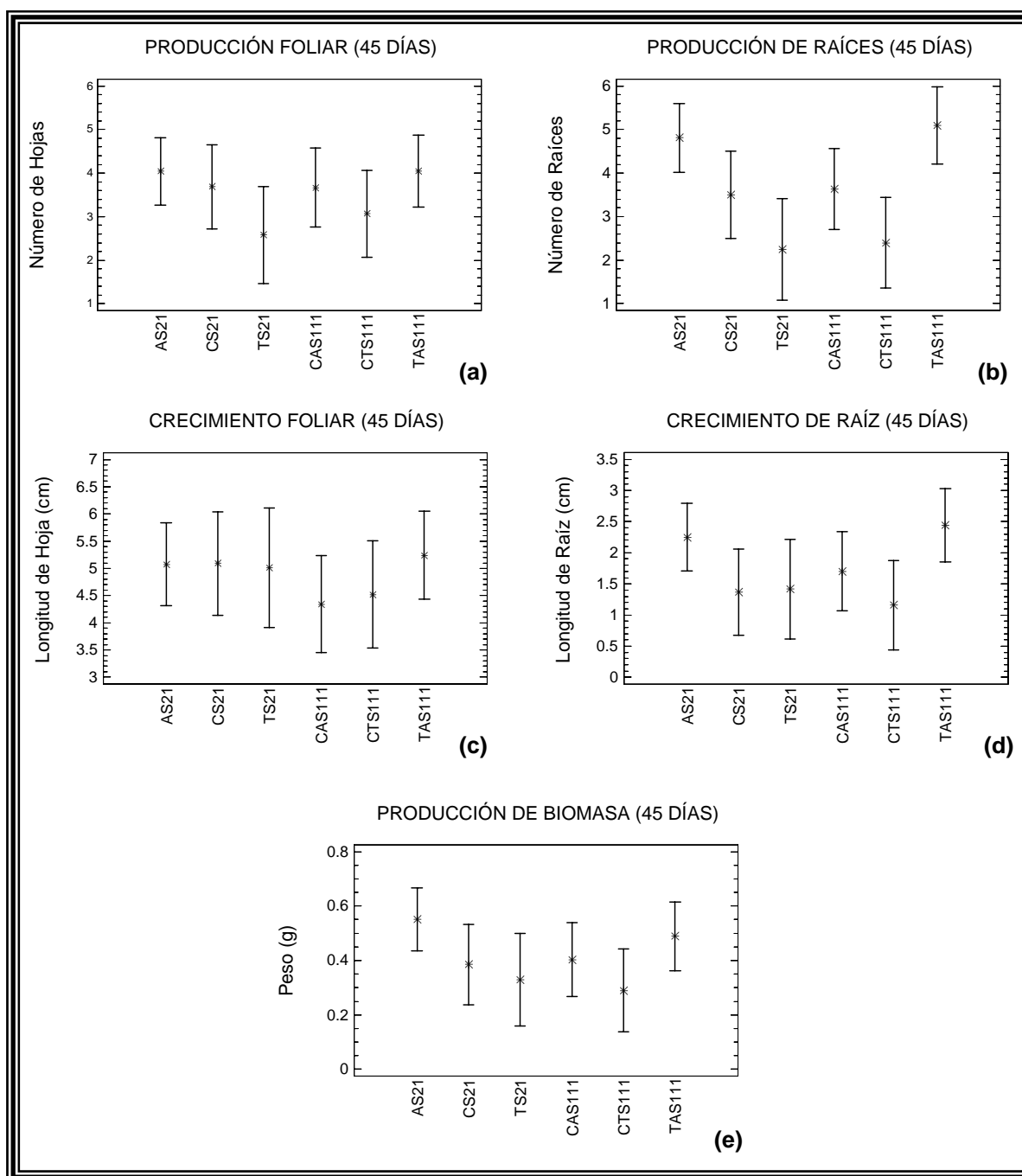
El mayor crecimiento de la hoja y raíz fue registrado en la mezcla TAS111, incrementando el promedio de la longitud de la hoja (Tabla 11 y Gráfica 15 c y d) respecto el inicio de la prueba (Tabla 10). En contraparte la mezcla CAS111 presentó pérdida en la longitud foliar y la mezcla CTS la mayor pérdida radical (Tabla 11).

Tabla 11. Efecto de las mezclas de sustratos en las variables analizadas a los 45 días.

SUSTRATO	Producción Foliar (#)	Longitud de Hoja (cm)	Producción de Raíces (#)	Longitud de Raíz (cm)	Peso (g)	Supervivencia (%)
AS21	4.04	5.07	4.80a	2.25	0.550	86.67
CS21	3.68	5.09	3.50ab	1.36	0.385	53.33
TS21	2.58	5.01	2.25b	1.41	0.329	40.00
CAS111	3.66	4.34	3.63ab	1.70	0.403	63.33
CTS111	3.06	4.52	2.40b	1.16	0.289	50.00
TAS111	4.04	5.24	5.09a	2.44	0.488	73.33

(Los números azules indican el valor de la *media* más alta por variable analizada, los números rojos indican el valor de la *media* más bajo por variable analizada, las variables *a* y *b* indican las diferencias entre medias)

La supervivencia en los primeros días se obtuvo en las plantas que se encontraban en la mezcla de agrolita y esfagnum, sin embargo, la mayor pérdida de plantas ocurrió en la mezcla TS21 (Tabla 11).



Gráfica 15. Efecto de las mezclas de sustratos en las variables analizadas.

[Mezclas de sustratos: Carbón – Agrolita – Esfagnum 1:1:1 (CAS111), Agrolita – Esfagnum 2:1 (AS21), Tezontle – Esfagnum 2:1 (TS21), Carbón – Esfagnum 2:1 (CS21), Carbón – Tezontle – Esfagnum 1:1:1 (CTS111) y Tezontle – Agrolita – Esfagnum 1:1:1 (TAS111)]

DIFERENCIAS ENTRE LAS MEZCLAS DE SUSTRATOS A LOS 90 DÍAS

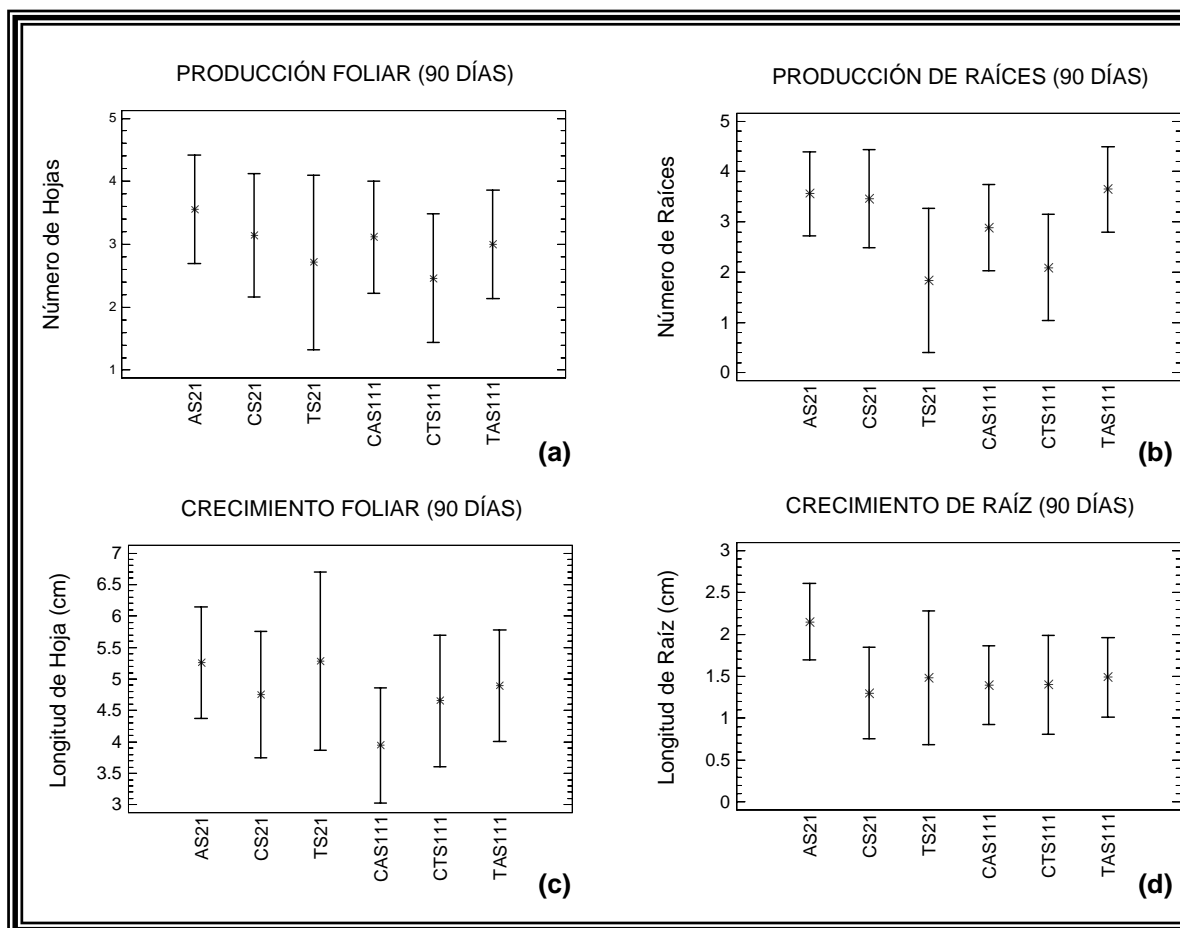
Al finalizar el experimento, las plántulas bajo el tratamiento con la mezcla AS21, presentó los valores más altos de la media de cinco variables analizadas

(Producción foliar, peso, supervivencia, longitud de hoja y raíz), solamente la producción de raíces obtuvo un valor mas alto en la mezcla TAS111 (Tabla 12 y Gráfica 16 a, b, c, d y e). Los valores más bajos, fueron registrados en los restantes tratamientos.

Tabla 12. Efecto de las mezclas de sustratos en las variables analizadas a los 90 días.

SUSTRATO	Producción Foliar (#)	Longitud de Hoja (cm)	Producción de Raíces (#)	Longitud de Raíz (cm)	Peso (g)	Supervivencia (%)
AS21	3.55	5.26	3.55	2.15	0.597a	63.33
CS21	3.14	4.75	3.46	1.30	0.329ab	46.67
TS21	2.71	5.28	1.83	1.48	0.332ab	23.33
CAS111	3.11	3.94	2.88	1.39	0.337ab	56.67
CTS111	2.46	4.65	2.09	1.40	0.236b	43.33
TAS111	3.00	4.88	3.64	1.48	0.353ab	60.00

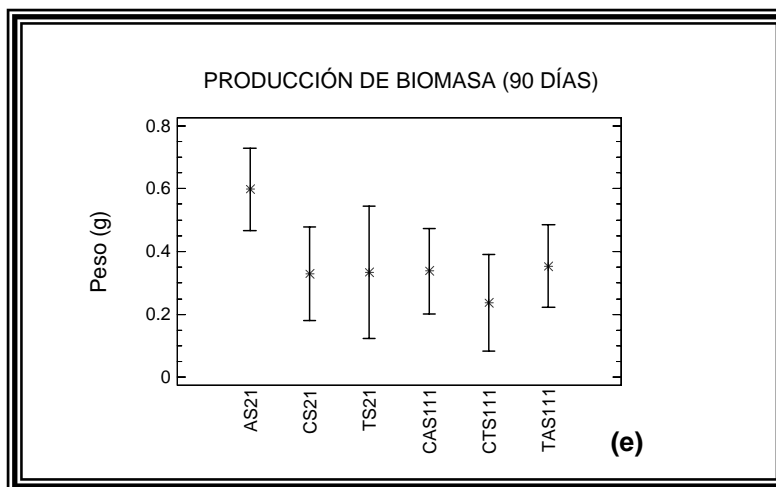
(Los números azules indican el valor de la *media* más alta por variable analizada, los números rojos indican el valor de la *media* más bajo por variable analizada, las variables *a* y *b* indican las diferencias entre medias)



... CONTINÚA

Gráfica 16. Efecto de las mezclas de sustratos en las variables analizadas.

... CONTINÚA



Gráfica 16. Efecto de las mezclas de sustratos en las variables analizadas.

[Mezclas de sustratos: Carbón – Agrolita – Esfagnum 1:1:1 (CAS111), Agrolita – Esfagnum 2:1 (AS21), Tezontle – Esfagnum 2:1 (TS21), Carbón – Esfagnum 2:1 (CS21), Carbón – Tezontle – Esfagnum 1:1:1 (CTS111) y Tezontle – Agrolita – Esfagnum 1:1:1 (TAS111)]

Nota: Se incluye en el Anexo II el análisis a detalle de las respuestas de las variables dependientes en función del tiempo y los sustratos.

EFECTO DE LOS FERTILIZANTES EN EL DESARROLLO EX VITRO

DIFERENCIAS ENTRE LOS TIPOS DE FERTILIZANTES A LOS 30 DÍAS

Durante el primer mes los fertilizantes foliares (FF) y el granular (FG) en concentración de 1.0 g/L presentaron un incremento en la producción foliar, siendo el FF 0.1 el fertilizante con el valor de media mayor (Tabla 14 y Gráfica 17 a), sin embargo, en comparación de los valores al inicio de la prueba, se registró una disminución de hojas en los fertilizantes restantes, incluyendo al testigo (Tabla 13 y Gráfica 17 a). El fertilizante foliar FF 0.5 mostró el mayor crecimiento de hoja y mayor peso. En la generación de raíces y crecimiento de la misma, el Fertilizante de Liberación Controlada (FLC) y el FG 0.5 respectivamente obtuvieron los valores de media más altos. (Tabla 14 y Gráfica 17 b y d).

Tabla 13. Efecto de los fertilizantes en las variables analizadas al inicio de la prueba.

FERTILIZANTE	Producción Foliar (#)	Longitud de Hoja (cm)	Producción de Raíces (#)	Longitud de Raíz (cm)	Peso (g)	Supervivencia (%)
TESTIGO	3.62	5.51	3.50	2.02	0.502	100.0
FOLIAR 1.0	4.25	5.01	4.12	1.65	0.462	100.0
FOLIAR 0.5	4.12	6.05	3.83	2.10	0.495	100.0
FOLIAR 0.1	4.75	5.25	5.00	1.58	0.440	100.0
GRANULAR 1.0	3.37	6.31	3.00	1.61	0.517	100.0
GRANULAR 0.5	4.62	5.28	4.12	2.82	0.511	100.0
GRANULAR 0.1	3.25	5.11	3.75	1.28	0.388	100.0
LIBERACIÓN CONTROLADA	3.25	5.20	4.00	1.88	0.510	100.0

(Los números azules indican el valor de la *media* más alta por variable analizada y los números rojos indican el valor de la *media* más bajo por variable analizada)

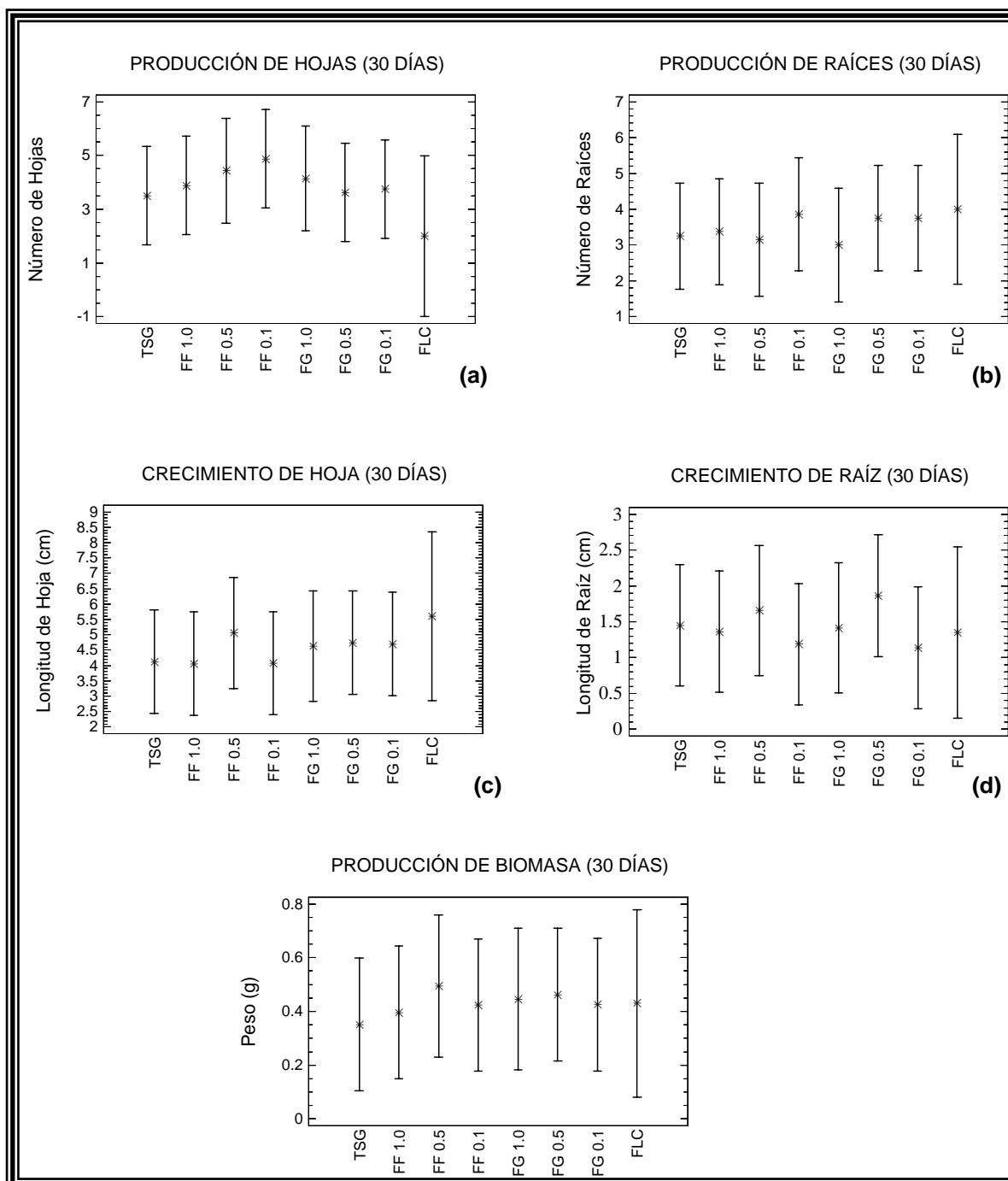
La menor generación de hojas y el menor porcentaje de supervivencia se presentó en FLC. Las plantas sin fertilización registraron la menor biomasa, de la misma forma en el FF 0.5 se observó la menor producción radical. Desde el inicio de la prueba y hasta los 30 días el menor crecimiento de hoja y la longitud de raíz, fue registrada en el FF 1.0 y FG 0.1 respectivamente (Tabla 13 y 14).

Tabla 14. Efecto de los fertilizantes en las variables analizadas a los 30 días.

FERTILIZANTE	Producción Foliar (#)	Longitud de Hoja (cm)	Producción de Raíces (#)	Longitud de Raíz (cm)	Peso (g)	Supervivencia (%)
TESTIGO	3.50	4.12	3.25	1.45	0.351	100.0
FOLIAR 1.0	3.87	4.06	3.37	1.36	0.395	100.0
FOLIAR 0.5	4.42	5.05	3.14	1.65	0.494	87.50
FOLIAR 0.1	4.87	4.07	3.85	1.18	0.423	100.0
GRANULAR 1.0	4.14	4.62	3.00	1.41	0.445	87.50
GRANULAR 0.5	3.62	4.73	3.75	1.86	0.462	100.0
GRANULAR 0.1	3.75	4.70	3.75	1.13	0.425	100.0
LIBERACIÓN CONTROLADA	2.0	5.0	4.00	1.35	0.430	50.00

(Los números azules indican el valor de la *media* más alta por variable analizada, los números rojos indican el valor de la *media* más bajo por variable analizada, las variables *a* y *b* indican las diferencias entre medias)

La supervivencia en los primeros 30 días se obtuvo en las plantas que se fertilizaron con fertilizantes granulares, foliares y el testigo (Tabla 14).



Gráfica 17. Efecto de las mezclas de sustratos en las variables analizadas.

[Fertilizantes: Testigo (TSG), Fertilizante Foliar 1.0 (FF 1.0), Fertilizante Foliar 0.5 (FF 0.5), Fertilizante Foliar 0.1 (FF 0.1), Fertilizante Granular 1.0 (FG 1.0), Fertilizante Granular 0.5 (FG 0.5), Fertilizante Granular 0.1 (FG 0.1) y Fertilizante de Liberación Controlada (FLC)]

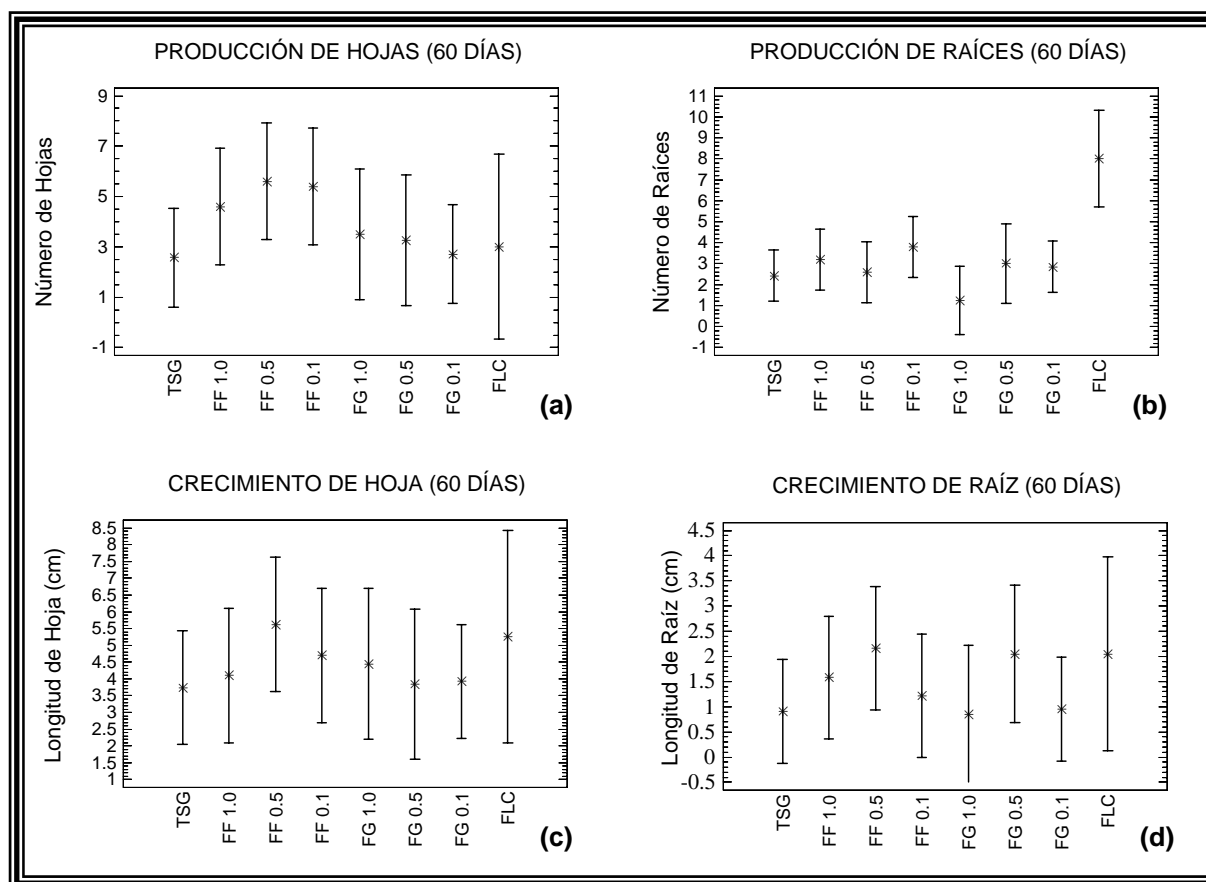
DIFERENCIAS ENTRE LAS MEZCLAS DE SUSTRATOS A LOS 60 DÍAS

Al finalizar el experimento, las plántulas bajo el tratamiento con fertilizante foliar en 0.5 g/L, presentó los valores más altos de la media de cuatro variables analizadas (Producción foliar, peso, longitud de hoja y raíz), solamente la producción de raíces obtuvo un valor mas alto en FLC y FF 0.1 (Tabla 15 y Gráfica 18 a, b, c, d y e). Los valores mas bajos, fueron registrados en el testigo, la menor producción y crecimiento de raíces se obtuvo en FG 1.0. Nuevamente el tratamiento bajo FLC presento el menor porcentaje de supervivencia (Tabla 15).

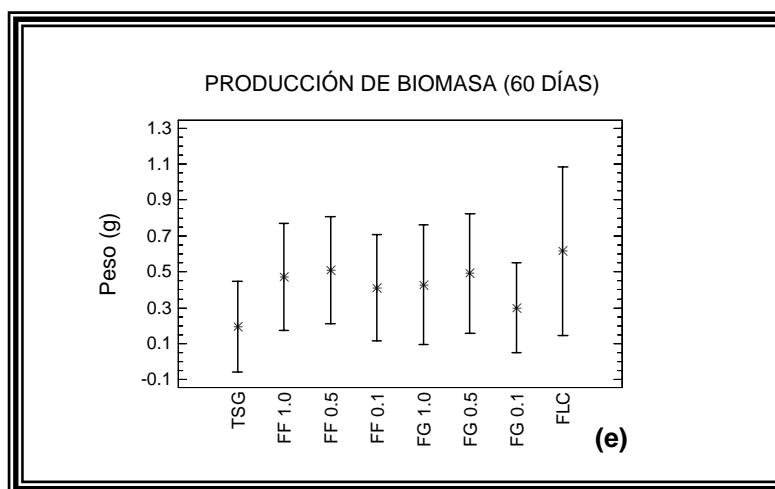
Tabla 15. Efecto de las mezclas de sustratos en las variables analizadas a los 60 días.

FERTILIZANTE	Producción Foliar (#)	Longitud de Hoja (cm)	Producción de Raíces (#)	Longitud de Raíz (cm)	Peso (g)	Supervivencia (%)
TESTIGO	2.57	3.73	2.42	0.91	0.194	87.50
FOLIAR 1.0	4.60	4.10	3.20	1.58	0.470	62.50
FOLIAR 0.5	5.60	5.62	2.60	2.16	0.508	62.50
FOLIAR 0.1	5.40	4.70	3.80	1.22	0.412	62.50
GRANULAR 1.0	3.50	4.45	1.25	0.85	0.427	50.00
GRANULAR 0.5	3.25	3.85	3.00	2.05	0.492	50.00
GRANULAR 0.1	2.71	3.92	2.85	0.95	0.300	87.50
LIBERACIÓN CONTROLADA	3.00	5.25	8.00	2.05	0.615	25.00

(Los números azules indican el valor de la *media* más alta por variable analizada, los números rojos indican el valor de la *media* más bajo por variable analizada, las variables *a* y *b* indican las diferencias entre medias)



... CONTINÚA



Gráfica 18. Efecto de las mezclas de sustratos en las variables analizadas.

[Fertilizantes: Testigo (TSG), Fertilizante Foliar 1.0 (FF 1.0), Fertilizante Foliar 0.5 (FF 0.5), Fertilizante Foliar 0.1 (FF 0.1), Fertilizante Granular 1.0 (FG 1.0), Fertilizante Granular 0.5 (FG 0.5), Fertilizante Granular 0.1 (FG 0.1) y Fertilizante de Liberación Controlada (FLC)]

Nota: Se incluye en el Anexo II el análisis a detalle de las respuestas de las variables dependientes en función del tiempo, tipo, forma de aplicación y concentración del fertilizante.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

EFFECTO DE LA LUZ FILTRADA EN EL CULTIVO *IN VITRO* DE LA ORQUÍDEA *Laelia autumnalis*

Las radiaciones actúan sobre las plantas como fuente energética para reacciones fotoquímicas y como estímulo de crecimiento y desarrollo, aunque también pueden resultar perjudiciales. Una influencia en las plantas puede verse en la determinación de la forma y tamaño foliar, a través de efectos estimulatorios tanto en división celular y expansión (Hart, 1988) Los distintos efectos de las radiaciones se manifiestan a través de la captación de dicha luz, cuya energía depende de la longitud de onda (Larcher, 1977).

Al modificar la calidad del estímulo lumínico, las semillas de *Laelia autumnalis* presentaron diferencias en su crecimiento y desarrollo durante la germinación al encontrarse bajo luz filtrada. Aunque la ausencia de luz no inhibe el proceso de germinación, las semillas bajo oscuridad retardan su crecimiento y su cambio de estado durante la prueba. St-Arnaud *et al.* (1992) analizó el efecto de la luz y la ausencia de la misma en plantas de *Cypripedium acaule* y encontró que este factor físico no alteraba el proceso de germinación. En otros estudios (Brand±o, *et al.* 1998; Light, 1994) realizados en semillas de *Dioscorea scabra*, *Paphiopedilum sp* y *Galeandra sp* demostraron que las condiciones de luz tienen influencia en la tasa de germinación, siendo esta más evidente en condiciones de oscuridad y en filtros que generan baja intensidad de luz.

Durante el primer mes de cultivo, todas las semillas a excepción de las tratadas en ausencia de luz se tornaron verdes. Como sucede en variedades híbridas de *Cattleya walkeriana*, en donde los embriones se tornan verdes alrededor de los 20 días (Obaidul, *et al.*, 1999). Durante este periodo, los filtros verde, naranja y rojo, indujeron una mayor velocidad de cambio de estado. Siendo nuevamente el tratamiento en ausencia de luz el que tuvo una menor velocidad para cambiar al estado siguiente.

A los dos meses de iniciado el desarrollo de las plántulas, los filtros azul, verde y amarillo presentaron la mejor respuesta en el desarrollo. En cuanto al filtro azul esta reportado (Seibert *et al.*, 1975) que este tipo de radiación de longitud de onda corta tiene un efecto positivo en el proceso inductivo de la formación de brotes. Sin embargo, para la diferenciación subsiguiente y el proceso de crecimiento Bonnet (1972), demostró que las plantas necesitan de la luz roja. En *Laelia autumnalis* a partir de los 90 días ocurrió la generación de la raíz. Ésta se presentó bajo los filtros azul, rojo y amarillo. La especie *Laelia autumnalis* bajo el filtro rojo alcanzó el estado máximo de desarrollo a los 130 días.

La filtración verde a los 60 días promovió la germinación y un constante desarrollo al alcanzar estados previos a la aparición de raíces, dicho filtro posteriormente, promovió el elongamiento del tallo. Folta (2004), demostró que la

luz monocromática verde actúa como señal regulando facetas específicas de la fisiología de las plantas inhibiendo el crecimiento en el cultivo de plantas. Los análisis indicaron un rápido incremento en la tasa de elongación del tallo, una respuesta contraria a lo inducido por otras condiciones de luz estudiadas.

El tratamiento en ausencia de luz obtuvo un mayor porcentaje de protocormos clorofílicos aun ovoides, con un primordio foliar en la región apical, en este tratamiento se registró un crecimiento diferente a los demás filtros ya que evidenció una coloración blanquecina en sus estructuras, así como el elongamiento del tallo y el acortamiento de los primordios foliares. Estas características morfológicas se asemejan al desarrollo mostrado por brotes de *Cattleya loddigesii* (Obaidul, 1999)

Por otro lado, uno de los tratamientos con mayor efecto positivo en el proceso de desarrollo fue el lote de plántulas bajo la filtración de luz azul. Ya que esta reportado que en algunas especies de orquídeas en ausencia de luz azul, las plantas pueden presentar un crecimiento anormal, como el retraso en la aparición de estructuras, la concentración de pigmentos, así como en su proliferación celular (Light, 1994).

Las plántulas bajo filtro amarillo, presentaron una elongación en sus primordios foliares y una hoja en la base del protocormo. Éstas características fueron similares al de las plántulas bajo filtro verde y naranja. Cabe destacar que en estudios sobre *Mougeotia sp.* el efecto de la luz monocromática naranja en interacción con el rojo lejano controlan ciertos procesos fotomorfogénicos debido a la respuesta en sus cloroplastos. Sin embargo en *Cattleya sp.* se presenta una menor elongación en los brotes a diferencia de tratamientos bajo otra calidad de luz (Obaidul, 1999).

Aparentemente se requiere forzosamente el estímulo de la luz filtrada para un cambio de estado ontogénico más rápido. Al inicio de la prueba el filtro verde fue uno de los promotores de la germinación hasta los 60 días, posteriormente el filtro azul y rojo, favorecieron la aceleración del desarrollo de las plántulas hasta el fin de la prueba, mientras que el filtro verde permaneció con un desarrollo más lento. Las raíces que presentaban las plántulas bajo el tratamiento con filtro verde tenían longitudes inferiores a los otros tratamientos, lo cual hace suponer que un gran contenido celular se concentro en estas estructuras. De esta forma se presenta el mismo patrón reportado en plántulas de *Cattleya sp.* ya que, bajo luz roja y azul, la tasa de desarrollo de las semillas fue significativamente mas rápida que aquellas semillas bajo luz verde (Obaidul, 1999)

Como se pudo observar, la calidad de la luz influencia morfológica y fisiológicamente la respuesta *in vitro* de las plántulas. La calidad de la luz puede, por consiguiente ser usada para modificar el desarrollo de las plántulas producidas *in vitro* y para algunas especies también puede afectar el crecimiento y la morfología después de transferirlas a condiciones *ex vitro* (Sæbø, *et al*, 1992)

EFFECTO DE LA CALIDAD DE LA LUZ EN LA PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS Y BIOMASA.

Al analizar los resultados bajo luz filtrada se encontraron similitudes entre la absorbancia y la tonalidad de tejido foliar, presentándose a una mayor absorbancia una mayor tonalidad.

Cabe destacar que con bajas cantidades de luz (10% de la radiación promedio), así como su calidad de luz puede ser suficiente para estimular o inhibir ciertas funciones fisiológicas o procesos morfológicos. Pueden ser radiaciones diez veces menores a las normales, las que pueden desencadenar el proceso de fotosíntesis (Light, 1994) El empleo de filtros tiene una repercusión en la producción de clorofilas y de algunos pigmentos secundarios, ya que si al comparar estos resultados de la luz filtrada contra el testigo, se encontró que este último y el tratamiento bajo luz azul, generan la mayor pigmentación foliar, concentración de clorofilas y absorbancia. Una posible explicación de este fenómeno presentado en las Graficas 7, 8 y 10 referente al testigo y al tratamiento bajo luz azul puede ser atribuido al tipo de lámpara utilizado en la experimentación.

La lámpara empleada en este estudio fue del tipo "Day light" donde la mayor proporción de luz emitida se encuentra en las longitudes de onda del azul (435-490nm). Este tipo de luz puede estar involucrado en diversos efectos relacionados con la fotosíntesis (Hart,1988), o bien, asociada a pigmentos como flavinas y carotenoides, siendo estos sus posibles fotorreceptores. Este tipo de luz promueve una mayor respuesta en el desarrollo de las plantas. Algunas especies de orquídeas en ausencia de luz azul, pueden presentar un crecimiento anormal (Light, 1994). De esta forma la producción de pigmentos clorofílicos pudo verse favorecida en los grupos testigo y azul debido a que las plantas absorben en mayor cantidad luz azul y roja.

En otro estudio, Seibert, *et al.*, (1975) evaluaron los efectos de ocho diferentes lámparas fluorescentes emisoras de bandas delgadas (371-750nm) y cuatro fuentes comerciales de luz fluorescente en el cultivo *in vitro* de tabaco. Las respuestas morfogénicas se presentaron en la luz cercana a la longitud de onda del ultravioleta al mostrar estimulación e inhibición en el crecimiento de callo y brotación, dependiendo de la intensidad de la luz. La estimulación del crecimiento y brotación ocurrió en la región de luz azul.

Las plantas superiores exhiben un amplio rango de coloración (pigmentación), visto particularmente en sus flores y manifestado en sus hojas en los cambios de estación. La diferencia en tonalidades evidencia de manera visual la composición pigmentaria de la lámina foliar, en la cual es clara la manifestación de pigmentos secundarios y clorofílicos en diferentes concentraciones.

Esta manifestación depende de la interacción de tres clases de pigmentos: las clorofilas que son responsables en la predominancia de verdes; los carotenoides transmiten muchos de los colores amarillo-naranja y los flavonoides que contribuyen con tonos azules, púrpuras y rojos. Fuera de esta variedad de compuestos sensitivos a la luz, solamente una parte de estas moléculas han sido establecidas como fotorreceptores. La vasta mayoría de pigmentos, aunque absorben luz, no están involucrados en la utilización de energía radiante (Hart, 1988).

En estas plántulas, evidentemente por la tonalidad que presentaban, se suponía encontrar una mínima cantidad de pigmentos en general, ya que por la ausencia del estímulo lumínico, los procesos fisiológicos de dichos individuos se ve inhibido, afectando considerablemente el mecanismo de la fotosíntesis (Gráfica 10).

A su vez este fenómeno también repercute en el estado de la planta, ya que en la naturaleza, el exceso de iluminación afecta de manera importante la pigmentación de las hojas, esto debido que las altas intensidades de luz generan la degradación de la clorofila y hacen evidente la manifestación de los pigmentos no clorofílicos (Fig. 16).



Figura 16. A la izquierda, características de una planta sujeta a luz directa de manera natural, a la derecha planta establecida de manera natural bajo la filtración de luz por el follaje superior.

El uso de calidades diferentes de luz aplicada en orquídeas (*Cattleya sp*) en cultivo *in vitro*, demostró que las fuentes de luz roja, amarilla y azul aumentan el peso fresco y seco a diferencia de las plantas cultivadas bajo la luz verde. (Obaidul, *et al.*, 1999). En particular, las diferencias en producción y en peso seco se asocia a lámparas con emisión de luz azul lo que coincide con un alto contenido de clorofilas en hojas (Moe, 1997).

Hugo Jesús Sierra Jiménez

En todos los casos al hablar de biomasa, se refiere a la producción celular de la plántula, esto, de acuerdo al filtro empleado. Los filtros que permiten un mayor paso de iluminación pudieron haber favorecido la proliferación celular, mientras que algunos filtros que permitieron un menor paso de luz registraron los menores valores de producción celular: Lo que indica que las plántulas a mayor iluminación, mayor producción celular o células mas pequeñas con menor cantidad de agua. En contra parte, plantas a menor iluminación, menor producción celular o células más grandes con mayor cantidad de agua.

EFFECTO DE LA MEZCLA DE SUSTRATOS EN LA ACLIMATIZACIÓN Y EN EL DESARROLLO *EX VITRO*.

Damon, *et al.* (2005) reporta que la tasa de mortalidad de algunas orquídeas nativas de Chiapas (*Cattleya aurantiaca*, *Brassavola nodosa*, *Prosthechea (Encyclia) chacaoensis*, *Anathallis (Pleurothallis) racemiflora*, *Cattleya skinneri*, *Cycnoches ventricosum* and *Encyclia cordigera*) durante la fase de aclimatización fue alta, los datos registrados oscilaron entre un 60 y 90%. Mientras tanto la mortalidad registrada durante la aclimatización de *Laelia autumnalis* en este estudio resulto menor, ya que los rangos de perdida de plantas durante el proceso de aclimatización estuvieron entre el 36.67 y el 76.67%.

Al seleccionar un sustrato se deben de tomar en cuenta sus características físicas y químicas, ya que algunas cortezas de encino contienen sustancias toxicas e inhibitorias para la germinación y el desarrollo de los protocormos de ciertas orquídeas epífitas como *Encyclia tampense*. (Frei & Dodson, 1972). De ahí que el empleo de materiales inertes para evitar el aporte de componentes, lo cual permitió delimitar las variables analizadas (numero de hojas y raíces, longitud de hoja y raíz y peso fresco) durante el establecimiento *ex vitro*.

La pérdida de hojas fue general en todos los sustratos empleados. El crecimiento foliar es favorecido por la mezcla de sustratos de tamaño de partícula < 0.5 cm, así como con propiedades físicas (textura, porosidad, estructura etc.) que permitieran el establecimiento del sistema radical sin dañar dichas estructuras, como es el caso del sustrato con agrolita y tezontle. Por otro lado los sustratos a base de carbón presentaron las mayores deficiencias estructurales debido a la mínima retención de humedad, así como una baja porosidad, la cual no permitió un buen desarrollo de las raíces. El carbón fue empleado como sustrato en estudios realizados por Moraes, *et al.*, (2002) quien obtuvo buenos resultados en la producción foliar, peso fresco y numero de raíces en la especie *Dendrobium nobile*, de la misma forma obtuvo un mayor desarrollo en las plantas cultivadas bajo el tratamiento con fibra de helecho. (Moraes, *et al.* 2002).

El sustrato finamente tamizado suele provocar menores daños en el desarrollo de las raíces debido que permite un mayor acomodo al incrementar su longitud. Debido a esto, el establecimiento de las plantas resulto mas viable en el proceso de aclimatización en las mezclas de sustratos a base de agrolita y esfagnum. Algunos propagadores comerciales utilizan piedra volcánica mezclada con otros componentes como la corteza de encino en *Calanthe*, *Odontoglossum* y *Cattleya*, obteniendo un establecimiento adecuado que permita su desarrollo (Monk, 1995). Sin embargo para *Laelia autumnalis* el comportamiento en gran parte de los sustratos con tezontle fue similar entre si, presentando perdidas en raíces y en su longitud de la misma.

De las seis mezclas solo una obtuvo resultados positivos. La mezcla de agrolita – esfagnum incrementó su biomasa en un 15% respecto la evaluación

inicial. El comportamiento de la plantas en la mezclas de sustratos siempre se mantuvo positivo al incrementar su peso paulatinamente. En *Doritaenopsis*, el mayor peso puede verse favorecido cuando se mantienen bajo cultivo con esfagnum y perlita. en comparación con cultivos en corteza y fibra de coco.(Cui, *et al.*, 2004). Otros sustratos a base de tezontle y carbón provocaron pérdida de peso en esta especie. Esta pérdida en el peso fresco se debió a la caída hojas y raíces debido al compactamiento y la falta de aeración del sustrato el cual no permitió un desarrollo adecuado.

El empleo de esfagnum como sustrato común para la elaboración de las mezclas fue debido a su excelente retención de agua, su aeración adecuada y la capacidad de evitar la proliferación de patógenos. De la misma forma esta reportado para *Phalaenopsis sp* y *Encyclia boothiana* donde sustratos a base de esfagnum favorecieron el desarrollo de las plantas, al registrar la mejor respuesta al analizar el desarrollo de hojas, raíces, el crecimiento en la longitud de raíces, así como el incremento en el peso fresco y seco (Chen, *et al.* 2000; Stenberg y Kane, 1998). Esto permitió que las mezclas elaboradas tuvieran un equilibrio en cuanto a sus propiedades físicas.

Por lo anterior, la agrolita, fue el mejor sustrato empleado en el proceso de aclimatización, debido a su peso liviano, su capacidad de aeración, así como a su retención de agua y a su nula proliferación de patógenos. Estas condiciones permitieron el establecimiento de una mayor cantidad de plantas en condiciones *ex vitro* (63%) respecto a los otros sustratos. Por otro lado el tezontle resultó ser el sustrato con el resultado mas bajo en crecimiento y desarrollo de hojas y raíces, así como en la producción de biomasa, al presentar la mayor perdida de individuos durante la prueba (hasta un 76%) , esto pudo deberse a la dificultad de rehidratación del tezontle, ya que las plantas en el proceso de aclimatización requieren de un gran aporte de humedad para evitar su muerte por deshidratación.

La mezcla de agrolita – esfagnum obtuvo los mejores resultados, el principal, la mayor sobrevivencia, así como el crecimiento foliar y el incremento en peso fresco. En contraparte, la mezcla de tezontle – esfagnum presento un alta mortalidad, y un bajo desarrollo en el establecimiento *ex vitro*.

EFFECTO DEL MÉTODO DE APLICACIÓN Y TIPO DE FERTILIZANTE EN EL CRECIMIENTO.

Las plantas del grupo testigo presentaron el valor más bajo en peso debido a su nulo aporte de nutrimentos. A su vez el tratamiento de fertilización granular registró el promedio más bajo en la producción de raíces y la menor formación de hojas. Esto se pudo deber a varios factores, entre ellos pudieron intervenir la baja disponibilidad de nutrientes, así como su lixiviación al momento del riego, o en caso contrario, la concentraciones del fertilizante donde, en ciertos casos, como la especie *Doritaenopsis sp.*, el incremento en el número de raíces se ve favorecido en la aplicación de bajas concentraciones de nutrimentos (Cui, *et al.*, 2004). Las altas concentraciones pudieron haber provocado una saturación y por consiguiente una intoxicación, dando como resultado la muerte de las estructuras que se encontraban en contacto con el fertilizante. Para *Phalaenopsis* en concentraciones nutritivas de 0.25 y 0.50 g/L de fertilizante soluble 20-8.6-16 NPK, incrementaron de forma positiva los niveles de floración (Espinosa, 1997).

Por otro lado, la mayor producción de hojas la promovió la aplicación foliar. Esta forma de aplicación permitió la mayor asimilación de nutrientes, debido a que la penetración a través de la cutícula es un proceso de difusión y se ha encontrado que la entrada de una sustancia depende de la concentración, el tamaño de la molécula, la carga, la solubilidad en lípidos o la capacidad de adsorción del fertilizante (Acosta, 1991).

Los resultados mas altos en producción de raíces y peso fresco fueron promovidos por fertilizantes de liberación controlada. La disposición gradual de nutrientes permite que el aporte de los mismos sea continuo para la planta, aparte, la aplicación directa al sustrato permite la asimilación directa en el sistema radical, promoviendo así su desarrollo. Los resultados han sido buenos en cultivos con fertilizantes de liberación controlada. La producción es usualmente superior a aquellos fertilizantes convencionales de aplicación simple (Oertli, 1980).

Cabe hacer la aclaración que la producción de raíces y peso fresco en el caso del tratamiento con fertilizante de liberación controlada fue alta respecto a los otros tratamientos, sin embargo, la amplitud de los rangos entre las plántulas evaluadas hace suponer que no existe un desarrollo homogéneo entre los ejemplares. Por lo tanto los rangos mas homogéneos (plantas con características similares) fueron registrados en plantas tratadas con fertilizantes foliares. A su vez, el ambiente, también juega un papel importante, debido a que la baja humedad no permite que el fertilizante libere adecuadamente sus nutrientes, de esta manera, el uso de este fertilizante en periodos de baja humedad puede no promover el desarrollo de la planta. En ambientes controlados, esta exigencia de humedad, puede verse sustituida por un régimen controlado de riego, sin embargo al tener deficiencia de humedad repercute en el aporte nutritivo a la planta.

CONCLUSIONES

- La ausencia de luz, no inhibe el proceso de germinación *in vitro* de *Laelia autumnalis*, sin embargo, las semillas bajo obscuridad, retardaron su crecimiento y el cambio de estado morfológico.
- La calidad e intensidad de la luz modificada por medio de filtración, tienen un efecto directo en el desarrollo *in vitro* de *Laelia autumnalis*, ya sea acelerando o retardando el crecimiento y desarrollo.
- Las luces primarias verde, azul y roja, inciden en mayor proporción sobre las plántulas generando respuestas, como la velocidad de cambio de estado, inhibición o aparición de estructuras, tanto al inicio del proceso de germinación y desarrollo (verde) como al final (azul y roja).
- La filtración en luz azul incrementa la velocidad de cambio de estado y promueve la presencia de una mayor variedad de estados en las plántulas en un mismo periodo de tiempo.
- La formación de plántulas de *Laelia autumnalis* tiene una duración de 130 días.
- Bajo luz azul, obtienen las hojas la mayor pigmentación foliar y concentración de clorofilas.
- La ausencia de luz inhibe la pigmentación clorofílica en las plántulas. En contraparte el exceso de iluminación o la iluminación directa, promueve la producción excesiva de pigmentos secundarios y clorofílicos.
- La mayor concentración de las dos clorofilas y el total, se presenta en plántulas donde se recibió el estímulo de la iluminación no filtrada, por lo que fue evidente que la luz filtrada inhibe la presencia de clorofila.
- Las plántulas con filtros que permiten un mayor paso de la iluminación (naranja, amarillo), inducen mayor producción celular o células más pequeñas. En resumen una mayor biomasa.
- La combinación de agrolita y esfagnum fue la mejor mezcla de sustratos para aclimatización por el alto índice de supervivencia, a su vez, genera la menor pérdida de hojas, raíces y la mayor longitud de raíz y longitud foliar.
- El empleo de fertilizantes de liberación controlada favorece la producción de raíces y peso fresco.

Hugo Jesús Sierra Jiménez

- Los rangos mas homogéneos (plantas con características similares) fueron inducidos por fertilizantes foliares a diferencia de los fertilizantes de liberación prolongada.

RECOMENDACIONES

Para lograr la germinación pueden usarse filtros de luz naranja, amarillo, rojo o violeta, o bien sin filtración de luz.

Para el desarrollo de *Laelia autumnalis* se sugiere cultivarla *in vitro* bajo filtración verde tanto al inicio del proceso (30-45 días) de germinación y desarrollo, así como filtración azul y roja al final del cultivo (45-130 días).

Posterior a la etapa *in vitro*, el sustrato a base de agrolita y esfagnum en proporción 2:1 permite un adecuado establecimiento *ex vitro*, ya que genera la menor pérdida de hojas, raíces y la mayor longitud de raíz y longitud foliar. Además permite un mayor índice de supervivencia a diferencia de las otras mezclas de sustratos.

Para su fertilización el tipo de fertilizante sugerido es el fertilizante foliar aplicándolo a razón de 0.5 g/L semanalmente.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, A.& Vatsala, P. (1981). Introduction to orchids with illustrations and descriptions of 150 south Indian orchids. The St. Joseph's Press. India. 533 p.
- Acosta, C. (1991). Mecanismos de absorción foliar de nutrimentos. Universidad Autónoma Chapingo. México. 33 pp.
- Allikas, G. (2001). Rupicolous *Laelia* Culture. Orchids. The Magazine of the American Orchid Society. 70(4): 328-329
- Anderson, L. (1967). Literature review of orchid seed germination. American Orchid Society Bulletin. April 304-308
- Arditti, J. (1967). Factors affecting the germination of orchids seeds. Botanical Review. 33 (1): 1-83.
- Arditti, J., M.A. Clementes, G. Fast, G. Hadley, G. Nishimura, & R. Ernst. (1982). Orchid Biology, Reviews and perspectives II. Cornell University Press. USA. 390 p.
- Arditti, J. (1992). Fundamentals of orchid biology. John Willey and Sons, Inc. USA.
- Ávila, I. (1998). Orquídeas Michoacanas En: Museo Virtual de la Universidad Michoacana
(<http://www.umich.mx/museo/hist-natural/botanica/orquideas/orquideas-2.html>)
México.
- Baker, K., Mathes, M. & Wallace, B. (1987). Germination of *Ponthieva* and *Cattleya* seeds and development of *Phalaenopsis* protocorms. Lindleyana 2 (2): 77-124.
- Baker, M. & Baker, C. (1998). Orchid species culture: *Pleione*, *Pescatorea*, *Pharus*, *Phalaenopsis*, *Pholidota* and *Phragmipedium*. Timber Press, Portland Oregon 250 pp.
- Barba, A., Luna, S. y Romero, J. (2002) Orquideología básica. Biotemas. Unidad de Investigación en Biología Vegetal. FES Zaragoza. UNAM. 18p.
- Benzing, D. H. (1989). The mineral nutrition of epiphytes. In: Vascular plants as epiphytes: evolution and ecophysiology. Luttge. U. (ed). Springer Verlag. Berlin. pp. 351-375.
- Bonnet, H. 1972. Phytochrome regulation of endogenous bud development of root cultures of *Convolvulus arvensis*. Planta 106:325-330.

Biran, I. & Kofranek, A. (1981). The influence of sustained and alternating dark periods on the growth of three foliage plants. *Journal of American Society of Horticultural Sciences*. 106(1) 64:68.

Brand±o, M., Ferreira, Y. And Pedralli, G. (1998) The influence of light, temperature and storage in the germination of *Dioscorea scabra* and *D. filiformis* seeds. Second International Conference on the Comparative Biology of the Monocotyledons and Third International Symposium on Grass Systematics and Evolution. Australia.

Caneva, S. (1978). Orquídeas: Principales géneros y especies, su cultivo. Ed. Albatros. Argentina. 230 p.

Chen, Y-C.; Chang, C. & Chang, W-C. (2000). A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis*. *In Vitro Cellular and Development Biology Plant*, 36 (5): 420-423.

Cui, Y.; Jeon, M.; Hahn, E. & Paek, K. (2004) Concentration of nutrient solution and growing media affect growth and flowering of *Doritaenopsis* « Tinny Tender ». *Acta Horticulturae*, (644): 77-83.

Damon, A.; Pérez, M. y Rivera, M. (2005). Substrates and fertilization for the rustic cultivation of *in vitro* propagated native orchids in Soconusco, Chiapas. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 20(4): 214-222.

Debergh, P.C; Topooyanont, N.; Huylensbroeck, J.; Moreira, H. & Oyaert, E. (2000). Preparation of microplants for *ex vitro* establishment. *Acta Horticulturae*, 530: 269-275.

Dressler, R. L. 1990. *The Orchids. Natural History and Classification*. Harvard University Press, Londres.

Esau, K. (1985). Anatomía Vegetal. 3ra. Edición Ed. Omega S.A. Barcelona España. 779p.

Espinosa, J. (1997). Fertilización química y biológica de tres híbridos de orquídeas en condiciones de invernadero. Tesis. Colegio de Postgraduados. Montecillo México.

Folta, K. (2004) Green light stimulates early stem elongation, antagonizing light-mediated growth inhibition. *Plant Physiology*. 135: 1407-1416.

Frei, J. & Dodson, C. (1972). The chemical effect of certain bark substrates on the germination and early growth of epiphytic orchids. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 99(6): 301-307.

García, M. y Cuevas, M. (2000) Abonos, fertilizantes y aplicación. En: García, D.; Arceo, J. y Miranda, I. Apuntes de Agronomía II. Capítulo 6. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 156-167.

García, S. y Ávila, I. (1989) Estudio taxonómico de *Laelia autumnalis* (De la Llave & Lexarza) Lindl. (Orchidaceae). BIOTAM 1(3): 5-23.

Granada, C. y Villalobos, A. (1985). Manejo de plantas en invernadero. Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. pp. 161-168.

Halbinger, F. (1993). Laelias de México. Asociación Mexicana de Orquideología. A.C. México. 72 pp.

Halbinger, F. & Soto, M.A. (1997). Laelias of México. Orquídea (Mex.) Vol. 15. México.

Halpin, J., & Farrar, M. (1965). The effect of four different fluorescent light sources on the growth of orchids seedlings. American Orchid Society Bulletin. May 416-420.

Hart, J.W. (1988). Light and Plant Growth. Ed. Chapman and Hall. 204 pp

Heatcote, J. (2001). Lighting - Supplementing Light. Orchid Review. 110(1245): 175-178.

Hean, O. (1982). Uses of solutions with trace elements to influence the flowering and shelf life of flowers of *Oncidium Gloriana*. Orchid Review, 1982, 90(1066): 264-266.

Hew, C.; Lim, L. & Low, C. (1993). Nitrogen uptake by tropical orchids. Environmental and experimental botany, 33(2): 273-281.

JiuZhou, Z. (2005). Studies on optimized fertilization for *Cymbidium hybridum*. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 27(4): 553-556.

Keithly, J.; Jones, D.; & Yokohama, H. (1991). Survival and growth of transplanted orchid seedlings enhanced by DCPTA. HortScience, 26 (10): 1284-1286.

Klerk, G. (2000). Rooting treatment and the *ex vitro* performance of micropropagated plants. Acta Horticulturae, 530: 277-288.

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

Hugo Jesús Sierra Jiménez

- Kowallik, W. (1982). Blue effects on respiration. *Annual Review of Plant Physiology* 33(1) 51:72.
- Lapiner, J. (1973). Orquídeas Michoacanas. Comisión Forestal del Estado de Michoacán (CFEM). Serie técnica. época 2^a. Numero 4.
- Larcher, W. (1977). *Ecofisiología vegetal*. Ediciones Omega. España: 10-21 pp.
- Lewandowski, V. (1991). Rooting and acclimatization of micropropagated *Vitis labrusca* "Delawere". *HortScience* 26(5): 586-589.
- Light, M. (1994). Flasking problems and solutions. *The Orchid Review*. 102: 104-108.
- Llurba, M. (1997). Parámetros a tener en cuenta en los sustratos. *Revista Horticultura* N° 125 - Diciembre 1997.
- Luna, S. y Barba, A. (1995) Ecología general de las orquídeas. *Boletín de Investigación, educación y sus nexos*. UNAM 2(1): 10-16.
- Manrique, L. (1993). Greenhouse crops: a review. *Journal of Plant Nutrition*, 16(12): 2411-2477.
- Maroto, J.V. (1990). *Elementos de Horticultura General*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid
- McKendrick, S. (2000). *Manual para la germinación in vitro de orquídeas*. Ceiba Foundation for Tropical Conservation. Ecuador. 20pp.
- Moe, R. (1997). Physiological aspects of supplementary lighting in Horticulture. *Acta Horticulturae* No. 418 17-24.
- Molles, M.C. (1999). *Ecología: conceptos y aplicaciones*. WCB McGraw-Hill. Boston. 509 pp.
- Monk, R. (1995). A newcomer's guide to orchids. *Orchid Review* 103(1204): 215-217.
- Moraes, L., días, L. y Faria, R. (2002). Sustratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. *Acta Scientiarum Maringá*, v. 24, n. 5, p. 1397-1400.
- Moreno, P. (1996). *Vida y obra de granos y semillas*. Fondo de Cultura Economica. México.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15:473-477.

Obaidul, M., Matsui, S. & Ichihashi, S. (1999) Effects of light quality on seed germination and seedling growth of *Cattleya* orchids *in vitro*. Journal Japanese Society Horticulture Sciences 68(6) 1132:1138.

Oertli, J. (1980). Controlled-release fertilizers. Nutrient Cycling in Agroecosystems. 1(2): 103-123.

Pierik, R. (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ed. Mundi Prensa. Madrid. pp.. 127-132

Preece, J. & Sutter, G. (1991). Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: Debberg, P. & Zimmerman, R. Micropropagation. Technology and Application. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. p.p. 71-93.

Pridgeon, A. (1987). The velamen and exodermis orchids roots. In: Arditti, J. Orchid Biology: Reviews and perspectives Vol. IV. Cornell University Press. Ithaca N.Y. pp. 141-192.

Ramírez, J. (1996). Orquídeas. En: Biodiversitas Boletín bimestral de la CONABIO Año 2, Num. 1:1-5.

Rubluo, A., Chavez, V. & Martinez, A. (1989). *In vitro* seed germination and re-introduction of *Bletia urbana* (Orchidaceae) in its natural habitat. Lindleyana 4 (2): 68-73.

Sæbø, A., Krekling, T. and Appelgren, M. (1992). Influence of light quality on *in vitro* photosynthesis, leaf morphometry, leaf anatomy and field performance in micropropagated *Betula pendula* rooth. Acta Horticulturae 327:97-98.

Salinger, J.S. (1991). *Cymbidium*. En: Producción comercial de flores. Edit. Acribia S.A. pp. 245-259.

Seibert, M., Wetherbee, P. & Job, D. (1975). The effects of light intensity and spectral quality on growth and shoot initiation in tobacco callus. Plant Physiology 56(1) 130:139.

Sessler, J. G. (1978). Orchids and how to grow them. 1st. Ed. Prentice-Hall, INC. Englewood. N.J. 370pp.

Shushan, S. (1959). Developmental anatomy of an orchid, *Cattleya* x *Trimos*. In: The Orchids. Withner, L. (Ed.) Ronal Press Co. USA.: 45-72 pp.

Soto-Arenas, M.A. 1996. México (Regional account), pp. 53-58. En IUCN/SSC Orchid Specialist Group. Orchids. Status Survey and Conservation Action Plan, IUCN.

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

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

Terres, V.; Artetxe, A.; Beunza, A. (1997). Caracterización física de los sustratos de cultivo. *Revista Horticultura* N° 125 - Diciembre 1997.

Uosukainen, M.; Rantala, S.; Mannien, A. & Vestberg, M. (2000). Improvement of microplant establishment through *in vitro* and *ex vitro* exogenous chemical applications. *Acta Horticulturae* 530: 325-331.

Urbano, P. (1999). Utilización de fertilizantes con liberación controlada de nutrientes. *Vida Rural*. 82:37-40.

Vázquez, V. (1994). Cambios morfológicos, anatómicos y fisiológicos en plantas aclimatizadas de anturio y orquídeas. Tesis. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. pp. 10-73.

Vázquez, C. *et al.* (1997). *La Reproducción de las Plantas: Semillas y Meristemos* Fondo de Cultura Económica. México.

Villalobos, V. y Thorpe, T. (1991). Micropropagación: Conceptos, metodología y resultados. En: Centro Internacional de Agricultura Tropical. *Cultivos de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. Colombia. pp 128-141.

Wang, Y. & Greg, L. (1994). Medium and fertilizer affect the performance of *Phalaenopsis* orchids during two flowering cycles. *HortScience*, 29(4): 269-271.

Wang, Y. (2000). Impact of a high phosphorus fertilizer and timing of termination of fertilization on flowering of a hybrid moth orchid. *HortScience*, 35(1): 60-62.

Whitner, C. (1964). The Intensity of Light. *American Orchid Society Bulletin*. Marzo: 218-220.

Williams, N. (1982). The biology of orchids and euglossine bees. In: "Orchid Biology. Reviews and perspectives, II". J. Arditti (Ed.). Cornell Univ. Press. USA: 119-171.

Wook, J., Woo, Ch., Murthy, H. & Yoeup, K. (2003). Influence of quality and photoperiod on flowering of *Cyclamen persicum* Mill. Cv. "Dixie white". *Plant Growth Regulation* 40 (1) 7:10.

Hugo Jesús Sierra Jiménez

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

YunZhai, D. & SiQing, W. (2005). Effects of N, P, K on floral bud differentiation and flower quality of *Cymbidium* hybridum. Journal of Beijing Forestry University, Vol. 27, No. 3, pp. 76-78.

ANEXO I

DESINFESTACION DE LAS SEMILLAS.

El proceso de desinfestación (McKendrick, 2000) que consistió en los siguientes pasos:

- 1) Se preparó una solución de hipoclorito de sodio al 0.6% v/v (Cloralex®) y otra solución de alcohol etílico al 70% v/v.
- 2) Posteriormente se sumergieron los paquetes con las semillas en la solución de alcohol etílico (al 70%) durante 5 minutos, pasado este tiempo se decantó e introdujeron 5 minutos en la solución de hipoclorito de sodio (0.6% v/v) al cual se le adicionaron tres gotas de jabón líquido, esto para romper la tensión superficial y así asegurar de esta manera la desinfestación eficiente.
- 3) Después de este tratamiento se hicieron los enjuagues necesarios (3-4) a los sobres con agua destilada estéril para eliminar por completo el agente desinfestante.

Este último paso se llevó a cabo en condiciones de asepsia, en una campana de flujo laminar de aire en donde permanecieron hasta su siembra.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBAS DE VIABILIDAD

Se elaboraron dos sobres mas de papel filtro conteniendo al menos 100 semillas cada uno, se sometieron al proceso de desinfestación. Se colocaron en una caja de petri. Se le adicionó a esta 20 ml de cloruro de trifeníl tetrazolio al 1% p/v. Posteriormente, se cubrió la caja con papel aluminio para evitar al entrada de luz. Al paso de dos días se revisó la coloración de los embriones de las semillas por medio de un microscopio estereoscopio.

Se realizó un conteo de las semillas y se registraron los embriones pigmentados completamente de rojo, el porcentaje obtenido correspondió al porcentaje de viabilidad del lote de semillas.

COMPOSICIÓN Y ELABORACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

La composición del medio de cultivo Murashige y Skoog es:

Macronutrimientos	Fórmula	p/L
Nitrato de Amonio	NH ₄ NO ₃	16.5 g
Nitrato de Potasio	KNO ₃	1.9 g
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄	0.37 g
Fosfato Ácido de Potasio	KH ₂ PO ₄	0.17 g

Hugo Jesús Sierra Jiménez

Cloruro de Calcio	CaCl ₂	0.44 g
-------------------	-------------------	--------

Micronutrientes

Ácido Bórico	H ₃ BO ₄	6.2 mg
Sulfato de Manganoso	MnSO ₄ 4H ₂ O	22.3 mg
Sulfato de Zinc	ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.6 mg
Yoduro de Potasio	KI	0.82 mg
Molibdato de Sodio	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25 mg
Sulfato de Cobre	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025 mg
Cloruro de Cobalto	CoCl 6H ₂ O	0.025 mg

Solución de hierro

EDTA sódico	Na ₂ EDTA	37.3 g
Sulfato Ferroso	FeSO ₄ 7H ₂ O	27.8 g
Sacarosa		30 g
Agar-gel		5 g

p/L=peso/ Litro

Para la preparación del medio MS, se pesaron las sales basales (Sigma® 4.3 g/L), se adicionaron vitaminas (Tiamina [1 mg/L], Piridoxina [0.25 mg/L], Niacina [1.25 mg/L] y Myo-Inositol [100 mg/L]), carbohidratos (Sacarosa [30g/L]) y como medio de soporte se utilizó Agar-gel [5 g/L].

Todas las soluciones se prepararon en el momento de elaborar el medio nutritivo, a excepción de las soluciones concentradas de vitaminas (Tiamina, Piridoxina y Niacina) que se prepararon con anterioridad y se almacenaron en refrigeración a 6° C.

Se llevaron a cabo los siguientes pasos para la preparación del medio MS:

- 1) Se elaboraron las soluciones concentradas y pesaje de los componentes del medio.
- 2) A un vaso de precipitados se le agregó el 30 o 40% de agua destilada del volumen total a preparar y se colocó en una parrilla de agitación para la dilución de los componentes al ir adicionándolos.
- 3) Se pesaron las sales basales Sigma® de Murashige y Skoog. Se incorporaron lentamente hasta disolverlos.
- 4) Se incorporaron los componentes orgánicos previamente disueltos: a) Myo-inositol, b) Vitaminas c) Sacarosa.
- 5) Se aforó el medio con agua destilada al volumen necesario.

- 6) Se midió el pH y se ajustó a 5.6 con KOH y/o HCl a 0.1 N.
- 7) Se calentó el medio, se agitó constantemente y se le adicionó lentamente el agar-gel hasta disolverlo completamente (inicio de ebullición). Posteriormente se vertió el medio en cajas petri. Todo el material se esterilizó en autoclave a 1.5 Kg/cm² durante 15 minutos a 120°C de temperatura.

ANEXO II

RESPUESTAS DE LAS VARIABLES DEPENDIENTES EN FUNCIÓN DEL TIEMPO Y LOS SUSTRATOS.

DIFERENCIAS ENTRE SUSTRATOS CON AGROLITA

Producción foliar

La prueba estadística de Tukey arrojó significancia en los datos obtenidos, el decremento en la producción de hojas se dió en los sustratos de manera similar, esto, con una tendencia negativa al disminuir el número de hojas desde el inicio de la prueba (Gráficas 1a, 4a y 6a). El porcentaje de pérdida de hojas se encontró entre el 52% y 54%.

Longitud de hoja

Los resultados presentados al analizarse estadísticamente no presentaron significancia, sin embargo, la tendencia de los sustratos con agrolita indicaron (Gráfica 1b, 4b y 6b) que las tres mezclas de sustratos presentan diferencias. En cuanto la mezcla de sustratos AS21 (Gráfica 1a) presentó una tendencia positiva incrementando en un 5% la longitud foliar a los 90 días de prueba, en contraparte la mezcla de sustratos CAS111 (Gráfica 4a) presentó una pérdida gradual de la longitud de las hojas de las plántulas en proceso de aclimatización, el promedio de pérdida osciló entre un 8% y un 12% a los 45 y 90 días respectivamente. La mezcla de sustratos TAS111 (Gráfica 6a) a los 45 días presentó un incremento del 6%, posteriormente a los 90 días revisión se observó una pérdida en este rubro, quedando con una longitud promedio similar a la longitud de inicio de la prueba.

Producción de raíces

En todos los grupos, la tendencia fue negativa (Gráficas 1c, 4c y 6c), las mezclas de sustratos AS21 y TAS111 presentan el mismo patrón, inicialmente con un incremento en la producción de raíz y posteriormente para los 90 días de prueba una pérdida, los porcentajes de las mezclas de sustratos AS21 y TAS111 fueron similares con un 7% y 10% de ganancia y un 20% y 21% de pérdida respectivamente. La pérdida de raíces fue mayor en la mezcla de sustratos CAS111, el cual mantuvo una tendencia negativa y perdió raíces en un porcentaje del 35%.

Longitud de raíz

La tendencia de los sustratos con agrolita indicó que existe una pérdida en lo que se refiere a la longitud de las raíces de las plántulas en proceso de aclimatización, el promedio de pérdida osciló entre un 44% y un 56% (Gráficas 1d, 4d y 6d)

teniendo como mayor perdida en la longitud de raíz la mezcla de sustratos TAS111 (56%) y como menor perdida la mezcla de sustratos AS21 (Gráfica 1d).

Biomasa

La mezcla de sustratos AS21 indicó que existe una ganancia en lo que se refiere a biomasa de las plántulas a diferencia de las otras dos mezclas de sustratos, CAS111 y TAS111 ya que presentó la mayor perdida de biomasa de hasta un 23 y 11% a los 45 días respectivamente y de un 35% para el final de la prueba (Gráficas 4e y 6e). Para estas últimas mezclas de sustratos la tendencia fué negativa.

DIFERENCIAS ENTRE SUSTRATOS CON CARBON ACTIVADO

Producción foliar

En los tres sustratos que contenían carbón, los datos obtenidos fueron negativos, estos sustratos afectaron la producción foliar (Gráficas 2a, 4a y 5a), esto se mantuvo a lo largo del estudio. En la prueba estadística hubo diferencias significativas para los tres sustratos, donde la significancia se presento para los primeros días respecto la disminución foliar a los 45 y 90 días. La mezcla de sustratos CTS111 (Gráfica 5a) presentó el mayor porcentaje de perdida foliar, esto con un 39% por debajo de la evaluación inicial.

Longitud de hoja

Entre los sustratos con carbón hubo solamente incremento en el crecimiento de las hojas para una mezcla de sustratos, el CTS111 (1%) (Gráfica 5b). Esta mezcla presentó una perdida mínima (2%) a los 45 días y un repunte para los 90 días. La mezcla CS21 (Gráfica 2b), presentó un incremento del 1% para los 45 días y una perdida del 6% para los 90 días. La mezcla CAS111 presentó una tendencia negativa obteniendo la mayor perdida de las tres mezclas con un 16%. (Gráfica 4b).

Producción de raíces

La tendencia en la producción radical de las mezclas fue negativa (Gráficas 2c, 4c y 5c). Las tres mezclas disminuyeron su número de raíces a lo largo de la prueba (Gráficas 2c, 4c y 5c). Las mezclas CS21 y CAS111 registraron la menor perdida de raíces, disminuyendo su numero de raíces en un 35% (Gráficas 2c y 4c).

Longitud de raíz

Para las mezclas CS21 y CAS111 (Gráficas 2d y 4d) se presentó una tendencia negativa en la longitud promedio de raíz con un porcentaje de perdida del 57% y 54% respectivamente. Para la mezcla CTS111 al inicio de la prueba y hasta los 45

días se presentó una disminución en el crecimiento radical (65%) (Gráfica 5d). En el periodo de tiempo de los 45 a los 90 días se presentó un repunte en el crecimiento radical, presentándose un incremento en 7%, pero la longitud radical final fue la menos productiva en esta mezcla ya que presentó una pérdida final del 58%.

Biomasa

Entre las mezclas, la tendencia negativa de los valores disminuyó el peso fresco entre cifras del 47% y 35%, teniendo como la menor pérdida a la mezcla CTS111. Solo en una mezcla CTS111 (Gráfica 5e) los resultados analizados estadísticamente presentaron una significancia para los primeros 45 días con respecto a las otras evaluaciones.

DIFERENCIAS ENTRE SUSTRATOS CON TEZONTLE

Producción foliar

En estos sustratos, los datos obtenidos, los resultados fueron homogéneos, la tendencia fue negativa, solo la mezcla TS21 mostró un repunte en la evaluación final aunque el porcentaje de pérdida se mantuvo a lo largo de la prueba (57%). Por otro lado, las demás mezclas en los primeros 45 días obtuvieron una pérdida en la producción foliar (49% y 29%), para los 90 días, la tendencia continuó negativa (Gráfica 5a y 6a) y los porcentajes de pérdida se presentaron entre un 59% y 48%.

Longitud de hoja

Al igual que las otras mezclas, los datos obtenidos en mezclas con tezontle no presentaron significancia al ser analizados estadísticamente, sin embargo, se presentaron pérdidas mínimas (1%) en la longitud foliar para las mezclas TS21 y TAS111 (Gráficas 3b, 5b y 6b). Las mezclas TS21 y CTS111 (Gráficas 3b y 5b) presentaron a los 45 días de prueba una pérdida, sin embargo para los 90 días presentaron un repunte, siendo la mezcla CTS111 la que presentó un incremento del 2% en la longitud radical respecto a la longitud inicial.

Producción de raíces

Al analizar los resultados estadísticamente, las mezclas TS21 y CTS111 (Gráficas 3c y 5c) presentaron significancia de los valores iniciales con respecto a las evaluaciones subsecuentes. De las cuales se presentaron pérdidas en la producción de raíces. Estas pérdidas se encontraron entre los 67% y 54%. Para la otra mezcla (TAS111) a los 45 días se presentó un incremento del 10% en la producción radical, sin embargo para los 90 días registró una pérdida del 31% quedando un 21% por debajo de la evaluación inicial (Gráfica 6c). Siendo esta mezcla la que presentó la menor pérdida de raíces.

Longitud de raíz

Los datos obtenidos en la mezcla TAS111 no presentaron significancia al ser analizados estadísticamente, sin embargo, las dos mezclas restantes (TS21 y CTS111) presentaron significancia en los primeros 45 días respecto a las evaluaciones subsecuentes. Estas dos mezclas presentaron una pérdida del 61% y 58% para los 45 días respectivamente (Gráficas 3d y 5d). Para los 90 días registraron un pequeño repunte, sin embargo el porcentaje de pérdida se mantuvo por debajo del inicio de la prueba. En la mezcla TAS111 (Gráfica 6d) se presentó una tendencia negativa, lo que indica pérdida en el promedio de longitud radical. La pérdida en a los 90 días registró un porcentaje del 55% siendo esta la mezcla que registró la menor pérdida de longitud promedio de raíz.

Biomasa

Las mezclas en este rubro presentaron una tendencia negativa en pérdida de biomasa. En el análisis estadístico, los resultados son significativos. En las mezclas TS21 y CTS111 (Gráficas 3e y 5e) la significancia se mostró en los primeros 45 días con respecto a las evaluaciones subsecuentes, en la mezcla restante la existe significancia solamente entre los primeros 45 días respecto a la tercera. Las pérdidas de biomasa se registraron en porcentajes de entre 35% y 51%. Siendo la mayor pérdida la que presentó la mezcla TS21 y la menor pérdida la mezcla TAS111 (Gráficas 3e y 6e).

DIFERENCIAS ENTRE LAS MEZCLAS DE SUSTRATOS

Producción foliar

El análisis estadístico para todas las mezclas registró diferencias significativas para las primeras evaluaciones con respecto a las evaluaciones subsecuentes. En todas las mezclas la tendencia fue negativa, la pérdida de hojas fue general. Los rangos de pérdida oscilaron entre un 59% y 46%, donde la menor pérdida la registró la mezcla AS21 (Gráfica 1a) y la mayor pérdida la mezcla CTS111 (Gráfica 5a). Los datos analizados estadísticamente presentaron significancia en los primeros 45 días respecto con las evaluaciones subsecuentes.

Longitud de hoja

La longitud foliar fue positiva solo en dos mezclas (AS21 y CTS111), en estas mezclas hubo un crecimiento de entre el 5% y 2% respectivamente (Gráficas 1b y 5b). Las mezclas TS21 y TAS111 (Gráficas 3b y 6b) obtuvieron las mismas cifras al final de la prueba, registrando una pequeña pérdida del 1%. La mezcla con mayor pérdida fue la CAS111 (Gráfica 4b), el cual, registro un 16% menos en el promedio de longitud de hoja. Para estas mezclas no se presentaron diferencias significativas en los datos obtenidos.

Producción de raíces

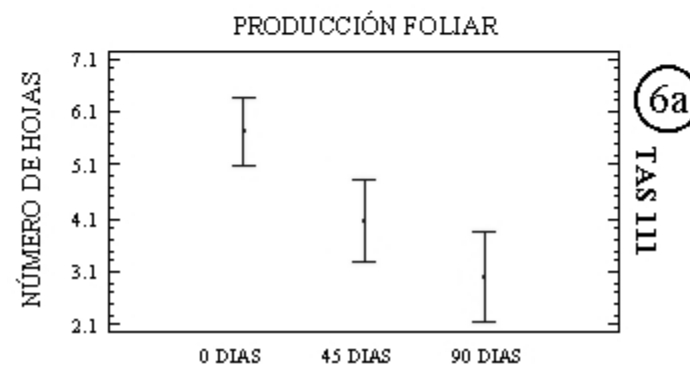
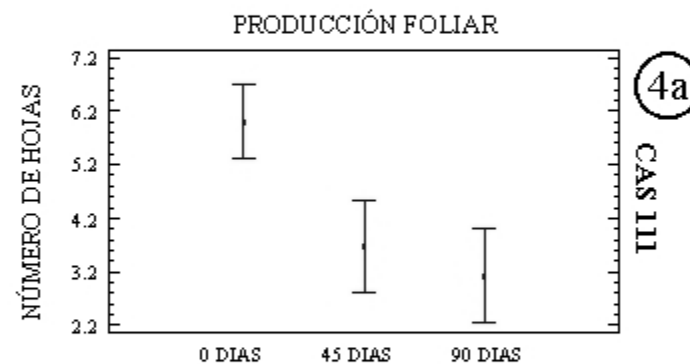
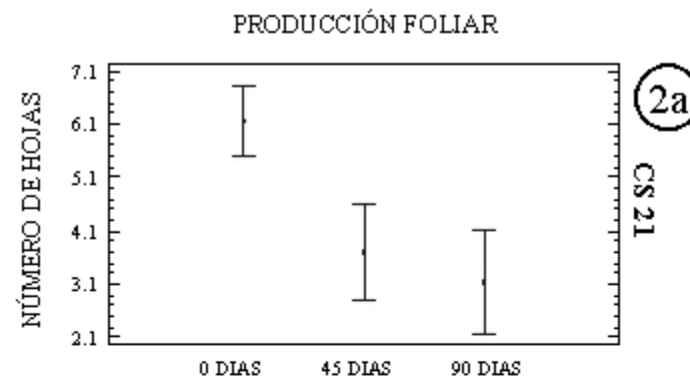
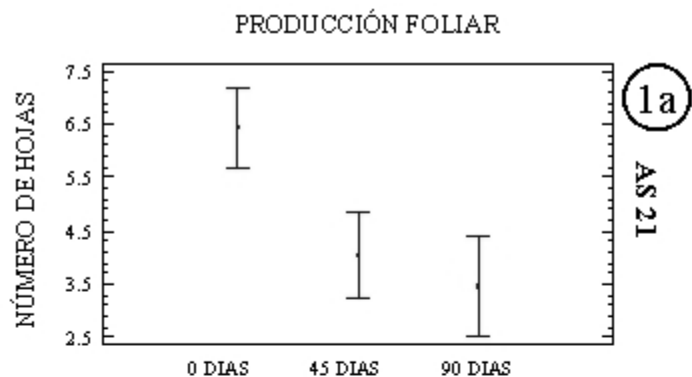
Solo cuatro mezclas presentaron significancia en sus resultados al ser analizadas estadísticamente (CS21, TS21, CAS111 y CTS111). En general el comportamiento de las mezclas fue el mismo, cuatro de ellas (CS21, TS21, CAS111 y CTS111) presentaron una tendencia negativa (Gráficas 2c, 3c, 4c y 5c). Siendo la TS21 la mezcla que registro la mayor perdida de raíces en un porcentaje del 66% (Gráfica 3c). Las otras 2 mezclas (AS21 y TAS111) registraron la misma tendencia teniendo un incremento de raíces de entre el 10% y 8% respectivamente para los 45 días (Gráficas 1c y 6c). Y posteriormente una perdida para la ultima evaluación registrando ambos una perdida porcentual de aproximadamente 20%-21%. Donde la mezcla AS21 mostró la menor perdida de raíces con un 20% (Gráfica 1c).

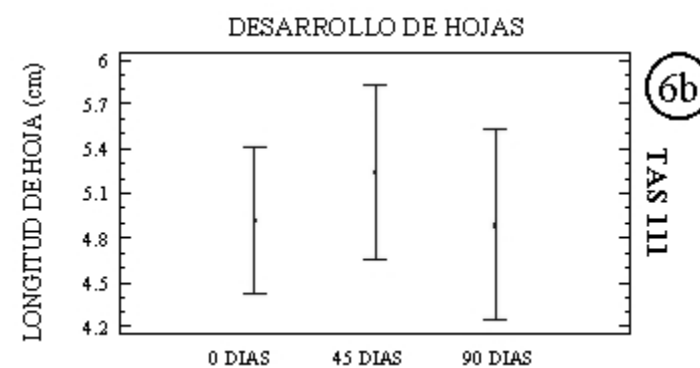
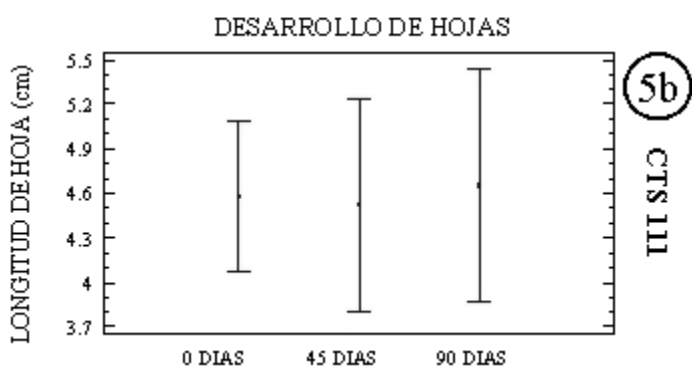
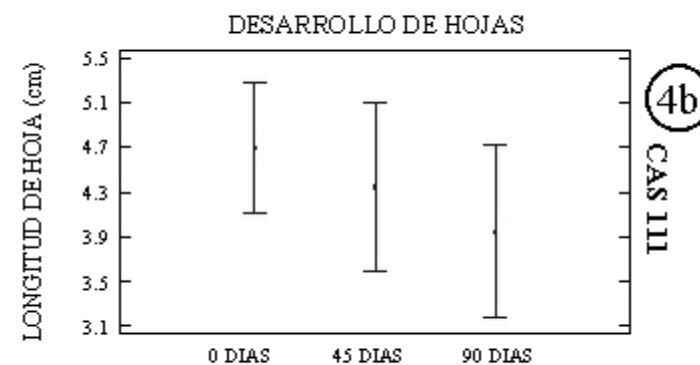
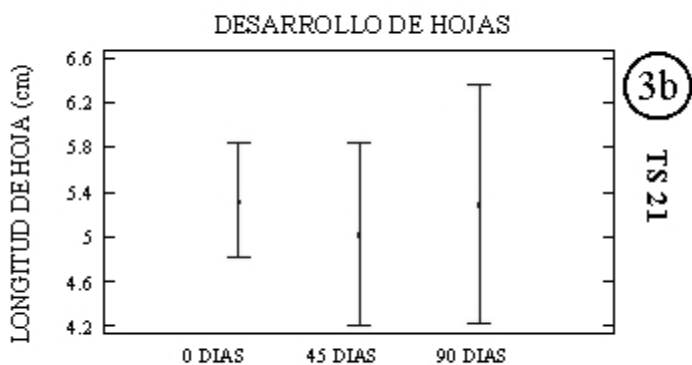
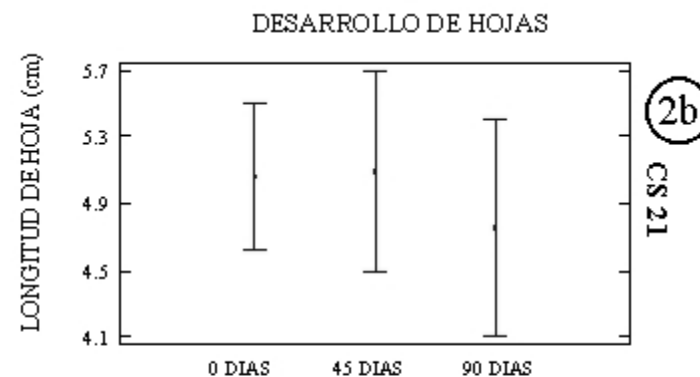
Longitud de raíz

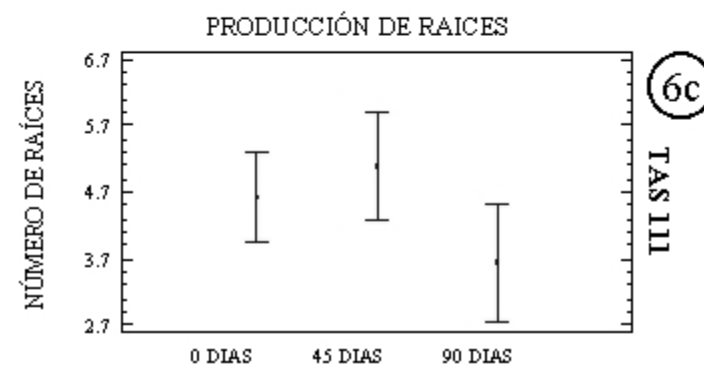
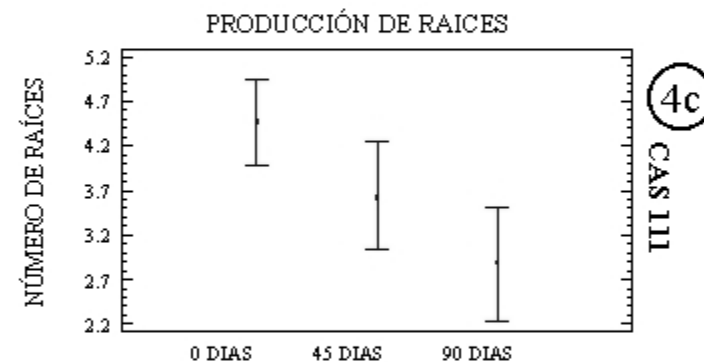
El análisis estadístico para todos las mezclas registró diferencias significativas para las primeras evaluaciones con respecto a las evaluaciones subsecuentes, excepto la mezcla TAS111, que registró significancia solo para la primera revisión respecto la evaluación final. Ningún tratamiento incrementó la longitud de la raíz, la tendencia fue negativa y disminuyó la longitud en las seis mezclas. Para los 90 días, solamente la mezcla TS21 obtuvo un repunte de solo 2% (Gráfica 3d). Este lote fue el que registró la mayor perdida de longitud de raíz (61%). La mezcla que registró la menor perdida de raíces fue el AS21 con un 44% (Gráfica 1d).

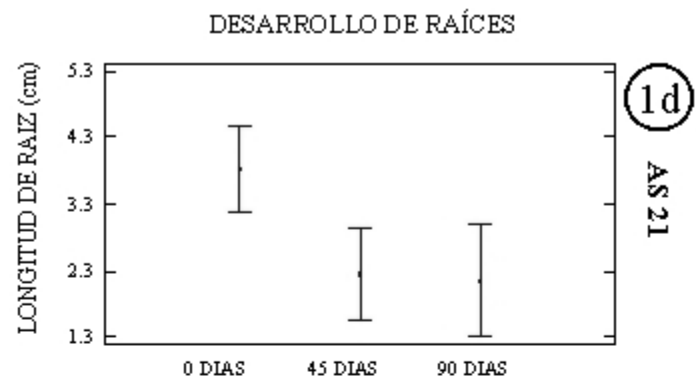
Biomasa

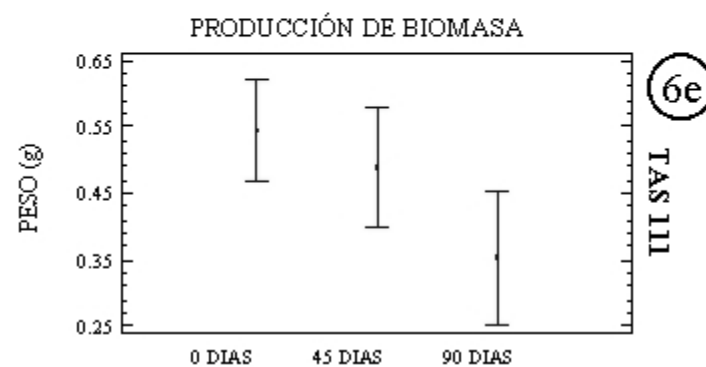
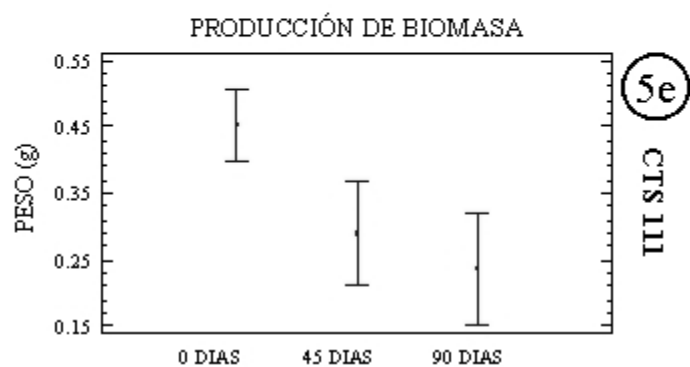
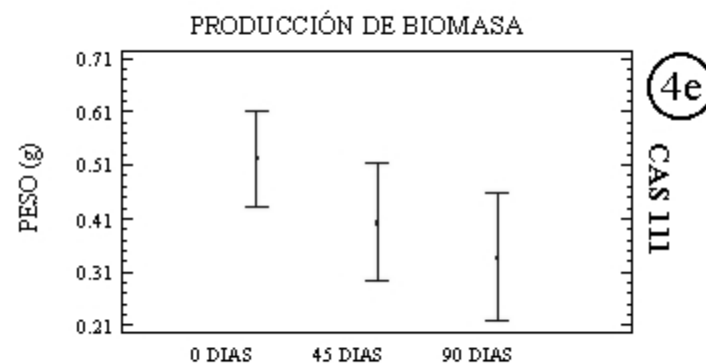
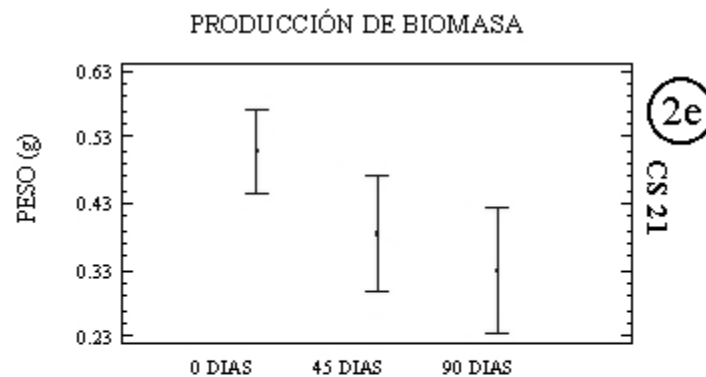
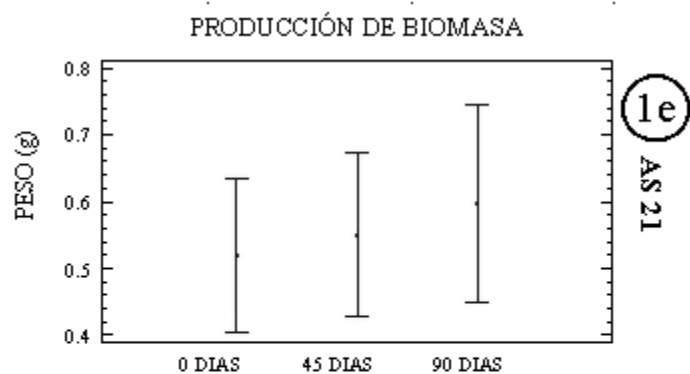
De las seis mezclas solo uno obtuvo resultados positivos. La mezcla AS21 incrementó su biomasa en un 15% respecto la evaluación inicial (Gráfica 1e). Su comportamiento de la mezcla siempre se mantuvo positiva. Las demás mezclas registraron una perdida siendo la mezcla TS21 la que registro la mayor perdida obteniendo un 51% menos de peso que el registrado en la evaluación inicial. (Gráficas 6e). El análisis estadístico presentó significancia para cuatro mezclas, dos de ellas (TS21 y CTS111) la diferencia significativa se presentó en los primeros 45 días con respecto a las evaluaciones siguientes. Para las mezclas CS21 y TAS111, las diferencias solo se presentaron entre la evaluación inicial y la final.











RESPUESTAS DE LAS VARIABLES DEPENDIENTES EN FUNCIÓN DEL TIEMPO, TIPO, FORMA DE APLICACIÓN Y CONCENTRACIÓN DEL FERTILIZANTE.

FERTILIZACION FOLIAR

Producción de hojas

La prueba estadística no arrojó significancia en los resultados obtenidos para las plantas tratadas con fertilizantes foliares, pero, porcentualmente, el incremento en la producción de hojas se dió en los tratamientos de manera similar, esto, con una tendencia positiva al incrementarse en número de hojas a los 30 días (Gráficas 2v, 3v y 4v). Este porcentaje de producción se encontró entre el 8% y 36%. En contraparte el grupo testigo presentó resultados de manera inversa, la tendencia de este grupo fue negativa, ya que de la evaluación inicial a la final, registro perdidas del 29% con respecto a la producción de hojas (Gráfica 1v).

Longitud de hoja

Los resultados al analizarse estadísticamente no presentaron significancia para las plantas tratadas con fertilizantes foliares, sin embargo, la tendencia de la fertilización foliar respecto al testigo indicó (Gráfica 1w, 2w, 3w y 4w) que inicialmente existió una pérdida en lo que se refiere a la longitud de las hojas de las plántulas en proceso de aclimatización, el promedio de pérdida osciló entre un 16% y un 25% teniendo como mayor pérdida en la longitud de hoja al grupo testigo y como menor pérdida a la concentración de Fertilizante foliar de 0.5 g/l. Posteriormente a los 60 días se observó un repunte en este rubro a excepción del grupo testigo, ya que este mantuvo la tendencia negativa y pasó de un 25% de pérdida a los 30 días, a un 33% hacia los 60 días.

Producción de raíces

En todos los grupos, tanto en los tratamientos de fertilización foliar así como en el testigo, la tendencia fué negativa (Gráficas 1x-4x), cabe destacar que el grupo testigo a los 30 días mostró menor pérdida de raíces que los tratamientos de la fertilización foliar (Gráfica 1x). La pérdida de raíces fué mayor en el tratamiento de fertilización foliar con concentración de 0.5 g/l (32%) (Gráfica 3x). Los tratamientos de 1.0 g/l y 0.1 g/l obtuvieron perdidas de raíces del 22% y 24% respectivamente (Gráficas 2x y 4x).

Longitud de raíz

La respuesta con fertilización foliar respecto al testigo indicó que inicialmente existió una pérdida en la longitud de las raíces de las plántulas en proceso de aclimatización, el promedio de pérdida osciló entre un 14% y un 22% (Gráficas 1y, 2y, 3y y 4y) teniendo como mayor pérdida en la longitud de raíz al

grupo testigo (28%) y como menor pérdida a la concentración de Fertilizante foliar de 0.1 g/l (Gráficas 1y y 4y). Posteriormente a los 60 días se observó un repunte en este rubro a excepción del grupo testigo y del tratamiento de 0.1 g/l, ya que mantuvieron la tendencia negativa y pasaron de un 28% y 14% de pérdida a los 30 días a un 55% y 23% hacia los 60 días respectivamente (Gráficas 1y, 2y, 3y y 4y).

Peso fresco

La fertilización foliar indicó que inicialmente existió una pérdida en lo que se refiere a la peso fresco de las plántulas respecto al testigo ya que este último presentó la mayor pérdida de peso fresco de hasta un 30% a los 30 días y de un 61% para el final de la prueba (Gráficas 1z, 2z, 3z y 4z). El fertilizante foliar presentó variaciones similares en las concentraciones de 1.0 g/l y 0.5 g/l donde hubo altibajos en la producción de peso fresco (Gráficas 2z y 3z), para el otro tratamiento de 0.1 g/l la tendencia fué totalmente negativa, aunque los valores no rebasaron el 7% de pérdida (Gráfica 4z).

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL FERTILIZANTE FOLIAR

Producción foliar

En los tres tratamientos de fertilización foliar, los datos obtenidos fueron positivos, estos tratamientos indujeron la producción foliar (Gráficas 2v, 3v y 4v), esto se mantuvo a lo largo de la prueba, a excepción del tratamiento de 1.0 g/l que presentó una pérdida (9%) durante el periodo de los 30 días (Gráfica 2v), sin embargo tuvo posteriormente un repunte final del 8% respecto al inicio de la prueba. Aunque en la prueba estadística no hubo diferencias significativas, el tratamiento con concentración de 0.5 g/l (Gráfica 3v) presentó el mayor porcentaje de producción foliar, esto con un 36% por encima de la evaluación inicial.

Longitud de hoja

Entre las concentraciones de fertilizante foliar no hubo un incremento en el crecimiento de las hojas para las tres concentraciones. En el periodo de tiempo entre los 30 y 60 días se presentó un repunte en el crecimiento foliar, registrando un incremento mayor en plantas fertilizadas con la concentración de 0.5 g/l, aunque este incremento no superó la longitud inicial. (Ver Gráfica 3w).

Producción de raíces

La tendencia en la fertilización foliar fue negativa para la producción de raíces (Gráficas 2x, 3x y 4x). Los tres tratamientos disminuyeron el número de raíces a lo largo de la prueba (Gráficas 2x, 3x y 4x). El tratamiento de 1.0 g/l registró la menor pérdida de raíces, disminuyendo su número en un 22% (Gráfica 2x).

Longitud de raíz

Al inicio de la prueba y hasta los 30 días se presentó una disminución en el crecimiento radical (Gráficas 2y, 3y y 4y). En el periodo de tiempo del primer y segundo mes se presentó un repunte en el crecimiento radical en el tratamiento con concentración de 0.5 g/l, este incremento superó en 3% la longitud inicial (Gráfica 3y).

Peso fresco

Entre las concentraciones de este tratamiento foliar, hacia los 30 días la tendencia de los valores disminuyó el peso fresco entre cifras menores del 1% a un 14% teniendo, como la menor pérdida al tratamiento con concentración de 0.5g/l y como mayor pérdida al tratamiento de concentración de 1.0 g/l (Gráficas 2z, 3z y 4z). Para el fin de la prueba estas dos concentraciones presentaron un repunte en la producción de peso fresco, superando aunque minimamente (2-1% respectivamente) el peso del inicio de la prueba (Gráficas 2z y 3z). El tratamiento restante disminuyó en un 6% su peso fresco respecto al inicio (Gráfica 4z).

FERTILIZACION GRANULAR

Producción foliar

En estos tratamientos, los resultados fueron heterogéneos, el grupo testigo a pesar de mostrar datos negativos (Gráfica 1v), obtuvo a diferencia del tratamiento de 0.5 g/l una menor pérdida foliar a lo largo de la prueba (Gráfica 6v). Por otro lado, los demás tratamientos superaron al testigo, en los primeros 30 días obtuvieron un incremento en la producción foliar, (15% y 22%) sin embargo, para los 60 días, la tendencia fue negativa (Gráfica 5v y 6v), solo el tratamiento de 1.0 g/l se mantuvo por arriba del número de hojas de la evaluación inicial, superando esta cifra en un 4% (Gráfica 5v).

Longitud de hoja

Al igual que la prueba de fertilización foliar, los datos obtenidos en la fertilización granular no presentaron significancia al ser analizados estadísticamente, sin embargo, nuevamente se presentó una pérdida en el crecimiento foliar, (Gráficas 1w, 5w, 6w y 7w) esto debido al proceso de aclimatización. El rango de pérdida se encontró entre un 11% y 27%, teniendo al tratamiento con concentración 1.0 g/l (Gráfica 5w) que mostró una pérdida en la longitud foliar superior al grupo testigo. A los 60 días, la tendencia se mantuvo, en ninguno de los casos se presentó un incremento en la longitud foliar que superara a la longitud inicial de cada tratamiento.

Producción de raíces

Los tratamientos de fertilización granular respecto al testigo difiere en la tendencia de la producción de raíces (Gráficas 1x, 5x, 6x y 7x). A los 30 días la fertilización granular y el testigo mantuvieron una pérdida mínima en raíces (Gráficas 1x, 5x, 6x y 7x), sin embargo a los 60 días el tratamiento de 1.0 g/l obtuvo la mayor pérdida registrada (59%) superando al testigo (30%) (Gráficas 1x y 5x).

Longitud de raíz

Los datos obtenidos en la fertilización granular no presentaron significancia al ser analizados estadísticamente, sin embargo, nuevamente se presentó una pérdida en el crecimiento de la raíz (Gráficas 5y, 6y y 7y). El rango de pérdida a los 30 días se encontró entre un 34% correspondiente a la concentración de 0.5 g/l y un 12% perteneciente a la concentración de 0.1% (Gráficas 6y y 7y). A los 60 días, la tendencia se mantuvo para el testigo y los tratamientos de concentraciones de 1.0 g/l y 0.1 g/l (Gráficas 1y, 5y y 7y), en el otro caso ([0.5 g/l]) se presentó un repunte en la longitud radical pero no logró superar a la longitud inicial del tratamiento (Gráfica 6y).

Peso fresco

El testigo indica que inicialmente existió una pérdida en lo que se refiere a la peso fresco de las plántulas respecto a la fertilización granular ya que el grupo control presentó la mayor pérdida de peso fresco de hasta un 30% en la segunda evaluación y de un 61% para el final de la prueba (Gráficas 1z, 5z, 6z y 7z). El fertilizante granular presentó variaciones heterogéneas en las tres concentraciones. Se registró una disminución constante en la producción peso fresco en el tratamiento con concentración de 1.0 g/l (Gráfica 5z) y variabilidad en el peso de los tratamientos restantes la que presentaron aumentos y pérdidas (Gráfica 1z, 6z y 7z).

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL FERTILIZANTE GRANULAR

Producción foliar

De los tres tratamientos, la concentración de 1.0 g/l obtuvo resultados positivos a los 60 días de la prueba (Gráfica 2v), los tratamientos de 1.0 g/l y 0.1 g/l mostraron tendencias positivas y negativas, presentando un incremento en la producción foliar para la segunda evaluación y una pérdida para los 60 días (Gráfica 2v y 4v).

Longitud de hoja

En lo que se refiere a las diferencias entre las concentraciones en ningún tratamiento se presentó un incremento en la longitud foliar, el tratamiento que mostró la menor pérdida fue el tratamiento con concentración de 0.1 g/l (Gráfica 5w).

Producción de raíces

La prueba estadística de Tukey ($F=4.13$ $p \geq 0.05$) para el tratamiento de 1.0 g/l obtuvo significancia en los resultados, donde hubo una diferencia entre la inicio de la prueba y los 60 días (Gráfica 5x). Para este tratamiento la pérdida de raíces presentó un porcentaje del 38%, la mayor de esta prueba (Gráfica 5x). Los tratamientos de 0.5 g/l y 0.1 g/l a su vez presentaron pérdidas no significativas de un 27% y 24% respectivamente (Gráfica 6x y 7x).

Longitud de raíz

Ningún tratamiento incrementó la longitud de la raíz, la tendencia inicial disminuyó la longitud en los tres tratamientos, para la evaluación final, solamente la concentración de 0.5 g/l tuvo un repunte acercándose al valor del tamaño de la raíz inicial mayor (Gráficas 5y, 6y y 7y).

Peso fresco

De los tres tratamientos ninguno obtuvo resultados positivos. La concentración de 1.0 g/l mantuvo pérdida constante de peso fresco a lo largo de la prueba registrando un 17% de pérdida final (Gráfica 5z). El tratamiento de 0.5 g/l aunque para los 60 días presentó un repunte respecto a la evaluación anterior, no fue suficiente para igualar el peso inicial (Gráfica 6z). Por otro lado el tratamiento de 0.1 g/l mostró un incremento positivo a los 30 días superando en un 9% la peso fresco inicial, sin embargo, al término de la prueba, la tendencia fue negativa disminuyendo su biomasa promedio en un 23%, se puede concluir que en el transcurso de los 30 a los 60 días disminuyó un 32% (Gráfica 7z).

FERTILIZANTE DE LENTA LIBERACION

Producción foliar

En la evaluación al primer mes de la prueba, los dos grupos presentaron pérdidas, solo que, en el tratamiento de liberación controlada, la pérdida fue superior (39%) a diferencia del testigo que solo tuvo pérdida del 3% (Gráfica 1v y 8v). Para los 60 días, el tratamiento de fertilización de liberación controlada obtuvo un repunte en la producción de hojas, pero no alcanzó la producción inicial, quedando 8% por debajo de esta cifra (Gráfica 8v). El grupo testigo mantuvo la

tendencia negativa, hasta tener pérdidas del 39% para el fin de la prueba (Gráfica 1v).

Longitud de hoja

Nuevamente los datos para esta prueba no fueron significativos estadísticamente, sin embargo, se presentó un incremento a los 30 días, a diferencia de los demás tratamientos al analizar el crecimiento foliar, el incremento presentado fue del 27% a diferencia del testigo el cual tuvo una pérdida del 25%. A los 60 días, el incremento que había mostrado este tratamiento se redujo un 26% quedando en un crecimiento neto de 1% al segundo mes durante la aclimatización (Gráfica 1w y 8w).

Producción de raíces

En este tratamiento contra el testigo, los resultados rebasaron las expectativas, la tendencia del tratamiento de liberación controlada contra el testigo fueron inversos, mientras que el testigo disminuyó la producción de raíces en un 31% el fertilizante duplicó su productividad (100%), destacando que no disminuyó su productividad a lo largo de la prueba (Gráfica 1x y 8x).

Longitud de raíz

Al inicio de la prueba en los grupos hubo una disminución en el crecimiento muy similar ($\pm 28\%$). Al término de la prueba, los resultados fueron dispares registrando pérdida de crecimiento en un 55% para el testigo y un incremento en la longitud de raíz del 9% (Gráficas 1y y 8y).

Peso fresco

El promedio de incremento de peso entre el tratamiento de fertilización de liberación controlada fue positivo al término de la prueba, aunque a los 30 días tuvo una disminución de peso fresco entre un 15%, para el final repuntó hasta alcanzar un 21% más del peso inicial a diferencia del testigo que su tendencia de pérdida fue continua a lo largo de la prueba (Gráficas 1z y 8z).

LA FERTILIZACION FOLIAR COMPARÁNDOLA CON LA FERTILIZACION GRANULAR

Producción foliar

Los datos finales presentaron diferencias entre el comportamiento de estos tratamientos: la heterogeneidad de los resultados del fertilizante granular contra la homogeneidad en los resultados de la fertilización foliar (Gráficas de la 2v-7v). Durante los primeros 30 días, la fertilización granular en dos de sus concentraciones (Gráficas 5v y 7v) obtuvo cifras superiores a los tres tratamientos

de fertilización foliar (Gráficas 2v, 3v y 4v), sin embargo, para el fin de la prueba la tendencia se invirtió, todos los datos de la fertilización foliar se mantuvieron por encima de la producción inicial (Gráficas 2v, 3v y 4v).

Longitud de hoja

La fertilización foliar presentó una menor pérdida de longitud foliar, mostró porcentajes de pérdida entre 7% y 18% (Gráficas 2w, 3w y 4w), en cambio la fertilización granular, obtuvo pérdidas superiores a las presentadas por la fertilización foliar, estas cifras estuvieron comprendidas entre los rangos porcentuales de 23% y 29% (Gráficas 5w, 6w y 7w). Por otro lado, también la fertilización foliar presentó una pérdida en la segunda evaluación, pero obtuvo un repunte para los dos meses (Gráficas 2w, 3w y 4w). Por su parte la fertilización granular presentó una tendencia negativa (Gráficas 5w, 6w y 7w).

Producción de raíces

Los patrones de productividad siguieron las mismas características en ambos tipos de fertilización, los dos con tendencia negativa, registrando una menor pérdida de raíces el fertilizante granular (Gráfica 2x, 3x, 4x, 5x, 6x y 7x).

Longitud de raíz

Tres tratamientos, dos de la fertilización granular (FG) (1.0 g/l y 0.1 g/l) y uno de fertilización foliar (FF) (0.1 g/l) registraron un decremento gradual en la longitud de raíz, de los cuales, la mayor pérdida la registró el tratamiento de fertilización granular con una concentración de 1.0 g/l (Gráficas 4y, 5y y 7y). Los tratamientos restantes FF 1.0 g/l, FF 0.5 g/l y FG 0.5 g/l, también presentaron el mismo patrón de efecto, primero con una disminución en la longitud para el primer mes y posteriormente un incremento en la longitud de raíz a los 60 días (Gráficas 2y, 3y, y 6y).

Peso fresco

Los tratamientos de fertilización foliar a 0.1 g/l y de fertilización granular a 1.0 g/l mantuvieron una tendencia de pérdida de peso fresco constante (Gráficas 4z y 5z). Mientras que hubo variaciones tanto positivas como negativas en la producción de peso fresco de los tratamientos restantes (Gráficas 2z, 3z, 6z y 7z). El incremento de peso fresco solo se presentó en dos de los tratamientos de fertilización foliar (1.0 g/l y 0.5 g/l) (Gráficas 2z y 3z), a diferencia de la pérdida general que presentaron los tratamientos de fertilización granular (Gráficas 5z, 6z, y 7z).

FERTILIZACION FOLIAR EN COMPARACIÓN DE LA FERTILIZACION DE LIBERACION CONTROLADA

Producción foliar

El tratamiento de fertilización foliar en su concentración de 1.0 g/l y el tratamiento de fertilización de liberación controlada tuvieron tendencias similares (Gráficas 2v y 8v), la diferencia radicó en que la producción foliar fué superior para el tratamiento de fertilización foliar (Gráfica 2v). Los otros dos tratamientos de fertilización foliar (0.5 g/l y 0.1 g/l) fueron superiores al tratamiento de liberación controlada, obteniendo mayor producción foliar (Gráficas 3v, 4v y 8v).

Longitud de hoja

La fertilización foliar presentó pérdida de longitud foliar, mostró porcentajes de pérdida entre 7% y 18% (Gráficas 2w, 3w y 4w), en cambio la fertilización de liberación controlada, obtuvo un incremento mínimo (1%) (Gráfica 8w). Por otro lado, la fertilización foliar presentó una pérdida en la segunda evaluación, pero obtuvo un repunte para la tercera y última evaluación (Gráficas 5w, 6w y 7w). Por su parte la fertilización de liberación controlada presentó una tendencia positiva a los 30 días (+27%) pero la tendencia se invirtió para el final de la prueba, disminuyendo el crecimiento foliar (+1%) (Gráfica 8w).

Producción de raíces

El fertilizante de liberación controlada promovió la producción de raíces a diferencia del fertilizante foliar (Gráficas 2x, 3x, 4x y 8x). El tratamiento de fertilización registró tendencias negativas en contraste con el fertilizante de liberación controlada que a lo largo de la prueba se mantuvo positivo.

Longitud de raíz

Los tratamientos de fertilización foliar con concentraciones de 1.0 g/l y 0.5 g/l junto con el tratamiento de liberación controlada siguieron el mismo patrón, los tres presentan una pérdida en la longitud de la raíz al primer mes y un repunte para el fin de la prueba (Gráficas 2y, 3y y 8y), mientras que el tratamiento restante (0.1 g/l) presentó una tendencia negativa (Gráfica 4y). El mayor porcentaje de incremento lo presentó el tratamiento de fertilización de liberación controlada con un 8% superando por un 5% el tratamiento de fertilización foliar de 0.5 g/l a los 60 días (Gráficas 3y y 8y).

Peso fresco

Aunque los tratamientos con las dos concentraciones más altas de fertilizante foliar obtuvieron un incremento en el peso fresco, el fertilizante de liberación prolongada, superó en un 18% más estas concentraciones (Gráficas 2z,

3z y 8z). La pérdida o la ganancia de peso fresco se mantuvo con altibajos sin mostrar tendencias constantes, salvo el tratamiento de fertilización foliar que fue constante su pérdida de peso fresco durante la prueba (Gráfica 4z).

LA FERTILIZACION GRANULAR EN COMPARACIÓN DE LA FERTILIZACION DE LIBERACION CONTROLADA

Producción foliar

El comportamiento del fertilizante granular promueve en un inicio un incremento en la producción foliar en sus tratamientos de 1.0 g/l y 0.1g/l (Gráficas 5v y 7v), posteriormente la tendencia es a la inversa, el comportamiento del fertilización de liberación controlada se manifiesta contrario al fertilizante granular, primero con una pérdida y después con un repunte (Gráficas 5v, 7v y 8v). Solo el tratamiento de fertilización granular de 0.5 g/l presenta una tendencia negativa a lo largo de la prueba (Gráfica 6v).

Longitud de hoja

La fertilización granular presentó pérdida de longitud foliar, mostró porcentajes de pérdida entre 23% y 29% (Gráficas 5w, 6w y 7w), en cambio la fertilización de liberación controlada, obtuvo un incremento mínimo (1%) (Gráfica 8w). Por otro lado, la fertilización granular presentó una tendencia negativa en el transcurso de la prueba (Gráficas 5w, 6w y 7w). Por su parte la fertilización de liberación controlada presentó una tendencia positiva en el primer mes (+27%) pero la tendencia se invirtió para los 60 días, disminuyendo el crecimiento foliar (+1%) (Gráfica 8w).

Producción de raíces

Al igual que la fertilización foliar, el fertilizante granular, presentó tendencia negativa a lo largo de la prueba, a diferencia, el fertilizante de liberación controlada promovió la generación de raíces (Gráfica 5x, 6x, 7x y 8x).

Longitud de raíz

Los tratamientos con concentración de 1.0 g/l y 0.1 g/l mantuvieron una disminución constante de longitud radical (Gráficas 5y y 7y), a diferencia de los tratamientos de fertilización granular con concentración 0.5 g/l y de liberación controlado que presentaron un repunte para la evaluación final (Gráficas 6y y 8y). Destacando de ahí el mayor aprovechamiento del fertilizante de liberación controlada en la producción de raíz, comparado con la pérdida de raíz de los tratamientos con fertilización granular (Gráficas 5y, 6y, 7y y 8y).

Peso fresco

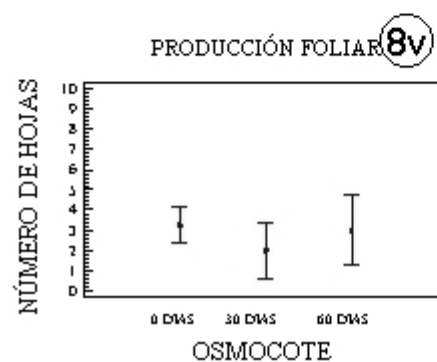
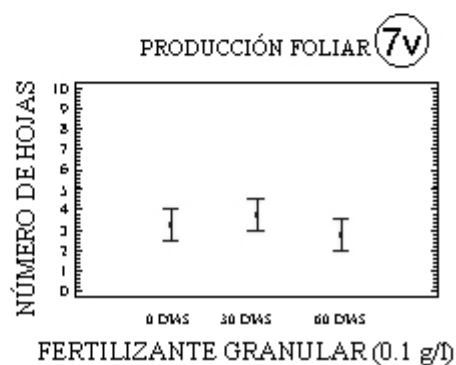
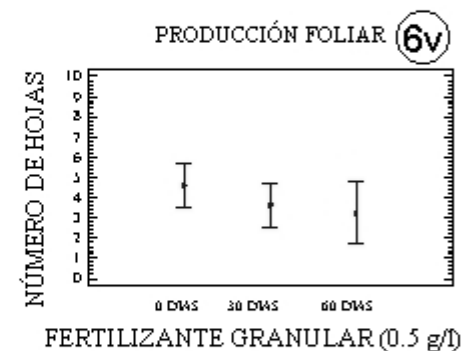
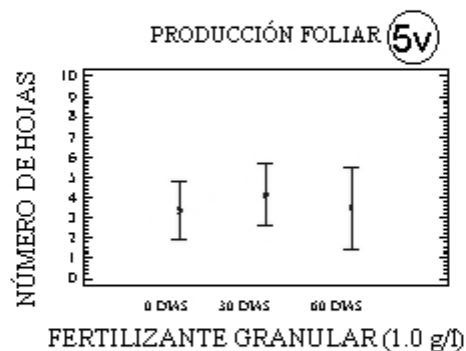
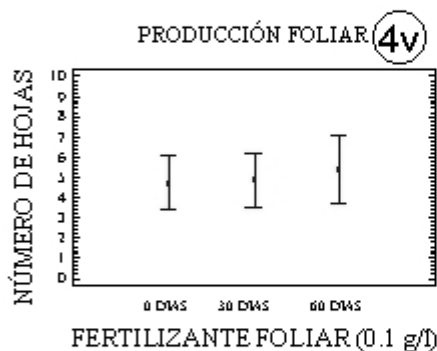
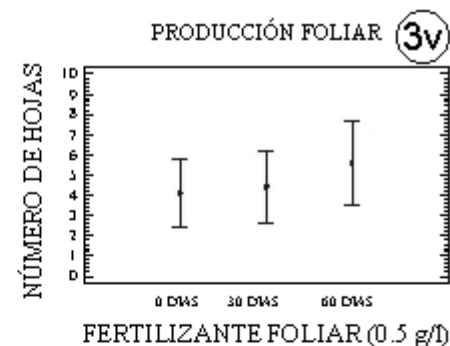
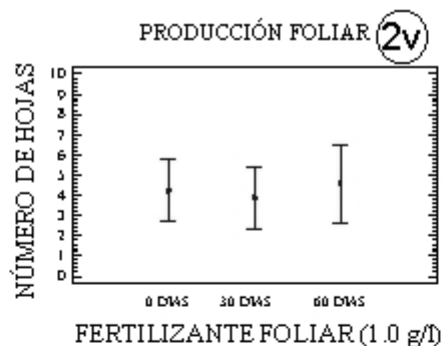
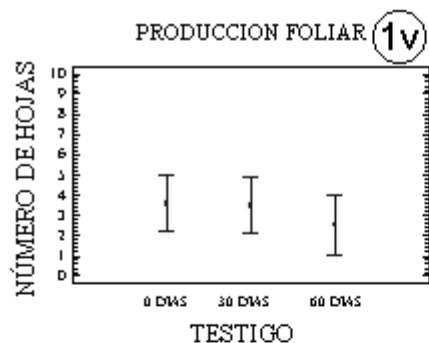
La fertilización granular presentó pérdida de peso fresco, mostró porcentajes de pérdida entre 4% y 23%, en cambio la fertilización de liberación controlada, obtuvo un incremento del 21% (Gráficas 5z, 6z, 7z y 8z). Por otro lado, la fertilización granular presentó una tendencia constante solo en el tratamiento de 1.0 g/l (Gráfica 5z). Por su parte los tratamientos de fertilización granular a 0.5% y de liberación prolongada mostraron una tendencia negativa a los 30 días, pero la tendencia se invirtió para los 60 días, aumentando la peso fresco, solo el fertilizante de liberación prolongada superó el promedio de peso fresco inicial (Gráficas 6z y 8z).

LA FERTILIZACION FOLIAR CONTRA LA FERTILIZACION GRANULAR EN COMPARACIÓN DE LA FERTILIZACION DE LIBERACION CONTROLADA Y EL TESTIGO

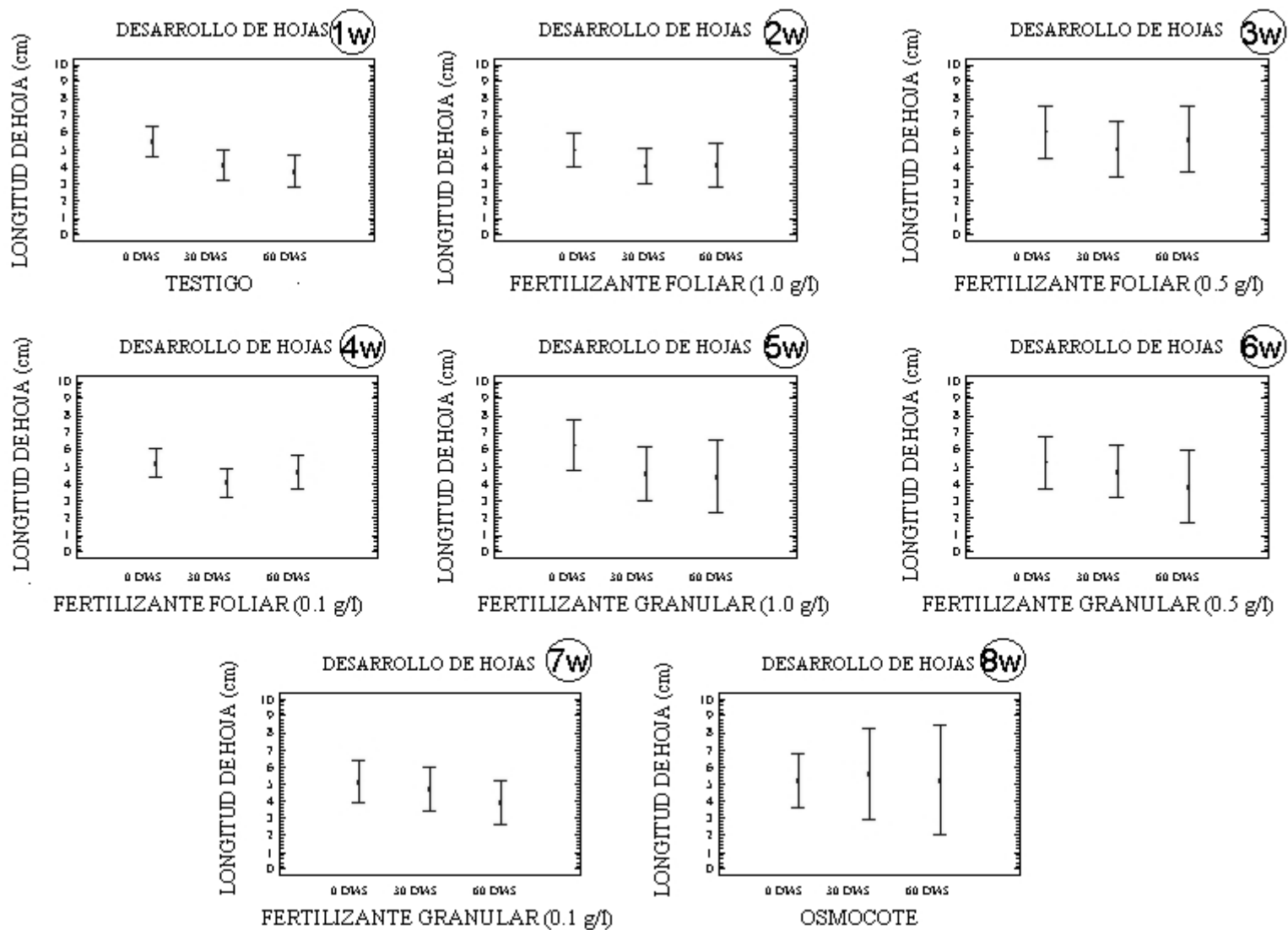
El grupo testigo presentó el valor más bajo en peso. A su vez el tratamiento de fertilización granular a 1.0 g/l de concentración registro el promedio mas bajo producción de raíces. En cuestión de producción foliar el tratamiento de fertilización granular a 0.5 g/l promovió la menor formación de hojas. Por otro lado, la mayor producción de hojas la promovió el empleo de fertilizante foliar al 0.5 g/l de concentración. Los resultados positivos en otros parámetros (producción de raíces y peso fresco) fueron promovidos por el empleo de fertilizantes de liberación prolongada.

Cabe hacer la aclaración que en estos últimos parámetros (producción de raíces y peso fresco) en el caso del tratamiento con fertilizante de liberación prolongada, la amplitud de los rangos entre las plántulas evaluadas hace suponer que no existe un desarrollo homogéneo entre los ejemplares. Por lo tanto los rangos mas homogéneos (plantas con características similares) fueron registrados en plantas tratadas con fertilizantes foliares.

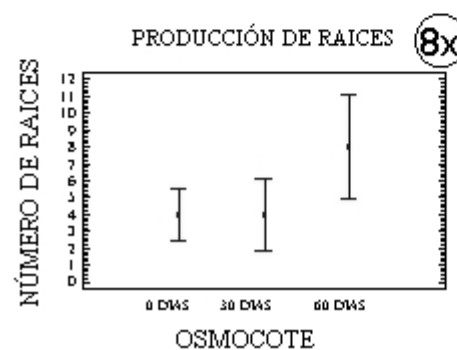
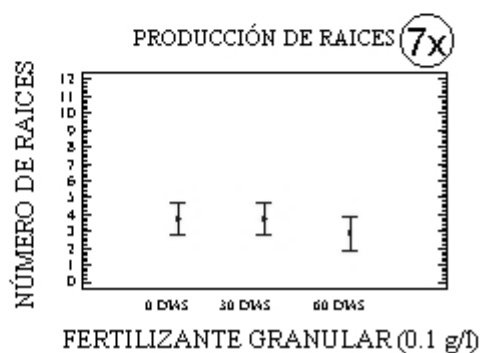
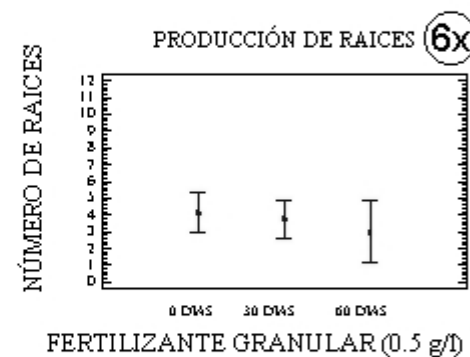
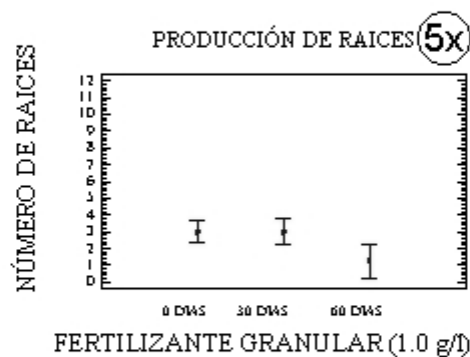
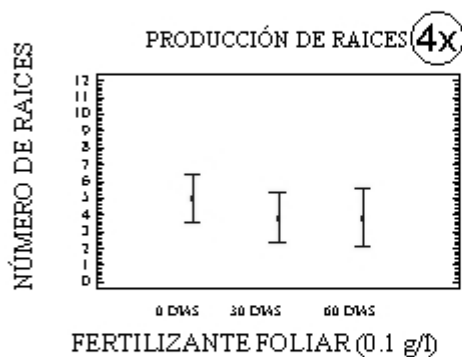
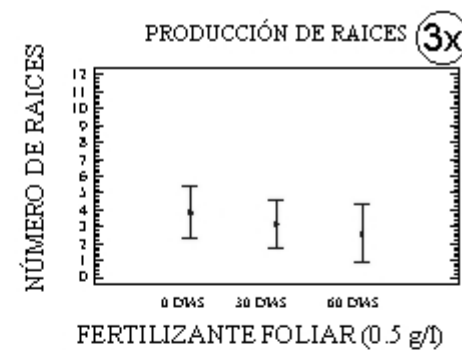
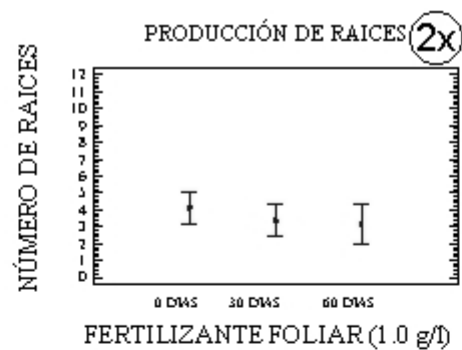
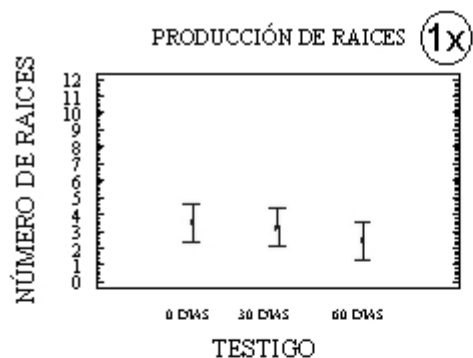
Hugo Jesús Sierra Jiménez



Hugo Jesús Sierra Jiménez



Hugo Jesús Sierra Jiménez



Hugo Jesús Sierra Jiménez

