



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**FERTILIZANTES COMERCIALES COMO SUSTITUTOS EN
EL CULTIVO *in vitro* DE *Laelia anceps* subsp. *anceps*
(ORCHIDACEAE). ESPECIE MEXICANA.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO
PRESENTA:**

RODRIGO ROMERO TIRADO

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

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA VEGETAL

D.F., MÉXICO

MARZO DE 2008



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**FERTILIZANTES COMERCIALES COMO SUSTITUTOS EN
EL CULTIVO *in vitro* DE *Laelia anceps* subsp. *anceps*
(ORCHIDACEAE). ESPECIE MEXICANA.**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO
PRESENTA:**

RODRIGO ROMERO TIRADO



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

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA VEGETAL

D.F., MÉXICO

MARZO DE 2008

DEDICATORIA

A mis padres, por todo el amor y esfuerzo invertidos
para ayudarme a alcanzar mis metas.

A mis tías Lindy y Leo, por el apoyo incondicional
tanto en los buenos como en los malos ratos.

A mi abuelita Leo y mi tío Payo, por haber sido
mis guías y cuidarme en todo momento. †

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México, la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por permitirme acceder a una excelente formación profesional.
- A mi directora de tesis, M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales, por la confianza y la asesoría otorgada durante el desarrollo de este proyecto.
- Al M. en C. Amadeo Barba Álvarez, que siempre estuvo presente para ayudarme a resolver tantas dudas y enriquecer con su aporte académico este trabajo.
- A mis sinodales, M. en C. María de Jesús Sánchez Colín, M. en C. Balbina Vázquez Benítez, Biol. Juan Romero Arredondo, M. en C. Amadeo Barba Álvarez y M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales. Sus aportaciones enriquecieron y mejoraron esta tesis.
- A mi familia, desde mis padres y hermanos, hasta mis tíos, abuelos y primos; que siempre se mantiene unida y es el motor que me impulsa a superar los obstáculos que se presentan en el día a día.
- A ti Rosy, que me haz regalado tanto amor y haz estado presente en cada momento trascendental de mi vida desde que tengo la dicha de tenerte junto a mi.
- A mis amigos, Huguito, Fer, Alejandra, Óscar y Cynthia, Itzia, Fausto, Hugo Sierra, Eli, por haber vivido tantas experiencias juntos y apoyarme en todo momento.
- A los doctores José Luís Gómez Márquez y Bertha Peña Mendoza, por obsequiarme su amistad y ser un soporte académico y moral.
- Al Biólogo Salvador López, mi entrenador y amigo. Tus consejos han sido muy útiles y reconfortantes.
- Al museo de la luz y mis compañeros, por contribuir a mi formación y darme la oportunidad de conocer muchísima gente y descubrir en la divulgación de la ciencia una actividad enriquecedora a nivel personal y profesional.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEÓRICO	
PANORAMA HISTÓRICO DEL USO DE LAS ORQUÍDEAS EN MÉXICO	5
FAMILIA ORCHIDACEAE.	
CARACTERÍSTICAS GENERALES	
Ecológicas	7
Morfológicas	8
FORMAS DE VIDA	11
GERMINACIÓN	
En su hábitat	12
NUTRICIÓN VEGETAL	15
TIPOS DE FERTILIZANTES	16
MÉTODOS DE FERTILIZACIÓN	17
FERTILIZACIÓN DE ORQUÍDEAS	18
ALTERACIONES NUTRICIONALES	20
MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE ESPECIES	22
Conservación <i>in situ</i>	22
Conservación <i>ex situ</i>	23
MICROPROPAGACIÓN	
GERMINACIÓN <i>in vitro</i>	24
CULTIVO <i>in vitro</i> COMO MÉTODO DE CONSERVACIÓN	25
COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO <i>in vitro</i>	26
SALES BASALES EMPLEADAS EN EL GÉNERO <i>Laelia</i> Y GÉNEROS AFINES	27
FERTILIZANTES COMO SUSTITUTOS DE LAS SALES BASALES DEL MEDIO DE CULTIVO <i>in vitro</i>	28

CARBOHIDRATOS EMPLEADOS EN EL MEDIO DE CULTIVO <i>in vitro</i>	29
Azúcares caseros	29
ACLIMATIZACIÓN DE PLANTAS	31
Sustratos para aclimatización	32
CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>Laelia anceps</i> subsp. <i>anceps</i>	34
DESCRIPCIÓN DE <i>Laelia anceps</i> subsp. <i>anceps</i>	34
DISTRIBUCIÓN DE <i>Laelia anceps</i> subsp. <i>anceps</i>	36
HIPÓTESIS	37
OBJETIVOS	
GENERAL	37
PARTICULARES	37
MATERIALES Y MÉTODO	
MATERIAL BIOLÓGICO	38
VIABILIDAD	38
ETAPA DE GERMINACIÓN	
MEDIOS DE CULTIVO PARA LA GERMINACIÓN	
Con sales basales	39
DESINFESTACIÓN DE SEMILLAS	41
SIEMBRA <i>in vitro</i> DE SEMILLAS	41
CONDICIONES DE INCUBACIÓN	41
EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN	41
ETAPA DE DESARROLLO DE PLÁNTULAS	42
MEDIOS DE CULTIVO	
Con fertilizantes comerciales	42
Con sustitutos de carbohidratos	44
EVALUACIÓN DEL DESARROLLO DE LAS PLÁNTULAS	44
ACLIMATIZACIÓN DE LAS PLÁNTULAS A CONDICIONES <i>ex vitro</i>	45
EVALUACIÓN DE LA ACLIMATIZACIÓN	47
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	48

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
VIABILIDAD	49
DESARROLLO DE LA GERMINACIÓN	
ESTADIOS DE DESARROLLO	50
VELOCIDAD DEL DESARROLLO Y BIOMASA DE PLANTULAS	59
ETAPA DE DESARROLLO	
FERTILIZANTES	62
CARBOHIDRATOS SUSTITUTOS	68
BALANCE ECONÓMICO DE LA SUSTITUCIÓN DE SALES BASALES Y SACAROSA	71
ACLIMATIZACIÓN	
SUPERVIVENCIA DE PLANTAS	72
DESARROLLO DE PLANTAS	73
CONCLUSIONES	78
BIBLIOGRAFÍA	80
ANEXO 1. INFORMACIÓN COMERCIAL DE LOS FERTILIZANTES PETERS PROFESSIONAL ® 24-8-16, FLOREN ® 10-15-5, Y FOLIFÉRTIL ® 20-30-10	89
ANEXO 2. SIMILITUDES ESTADÍSTICAS ENTRE LOS TRATAMIENTOS DE LA ETAPA DE GERMINACIÓN	90

RESUMEN

Laelia anceps Lindl. subsp. *anceps* es una orquídea nativa de México que se emplea tradicionalmente como planta de ornato, lo cual ocasiona una presión de colecta muy grande sobre sus poblaciones y, unido a la destrucción de su hábitat, están conduciendo a que la especie sea catalogada bajo riesgo de extinción en el mediano plazo.

Una alternativa para reducir la recolecta en campo es producir plantas mediante la propagación *in vitro* a partir de semillas, con la utilización de medios de cultivo de bajo costo, de fácil adquisición y elaboración.

En el presente estudio se sembraron semillas de *Laelia anceps* subsp. *anceps* provenientes de cápsulas maduras, sobre dos medios de cultivo habituales para la germinación *in vitro* de orquídeas, el Murashige & Skoog (MS) y el Knudson C (KC), al 100% y 50% de la concentración de sus sales, resultando más adecuado para la germinación y desarrollo inicial el medio MS al 100%.

Las plántulas obtenidas durante la germinación fueron transferidas a tres diferentes medios de cultivo, cuyos componentes minerales provenían de la adición de fertilizantes comerciales (Peters® 24-8-16, Folifétil® 20-30-10, y Floren® 10-15-5), cada uno se probó en tres concentraciones, 100%, 50% y 25 % de sus sales, la concentración al 100% de los medios con Peters y Folifétil fue 5 g L⁻¹, y para Floren de 10 mL L⁻¹, se utilizó como testigo el medio MS al 100%. Otros tres lotes experimentales de plántulas fueron subcultivadas en el medio nutritivo MS suplementado con tres diferentes fuentes de carbohidratos de uso casero (Azúcar refinada, azúcar no refinada, y piloncillo) en sustitución de la sacarosa grado analítico, la cual se utilizó como testigo.

El desarrollo de las plántulas fue significativamente mayor en los medios de cultivo con los fertilizantes Peters y Floren al 25 %, estas presentaron un mayor vigor, rápido crecimiento y mejor apariencia. En los medios con azúcar refinada y azúcar no refinada, las plántulas se desarrollaron de forma similar a las del medio con sacarosa grado analítico. Estos resultados permitieron la propagación de *Laelia anceps* subsp. *anceps* en medios de cultivo de preparación muy sencilla y de muy bajo costo.

Finalmente se llevó a cabo la aclimatización *ex vitro* de las plántulas con dos tallas diferentes (4.5 y 8.5 cm), dentro de botellas de plástico PET transparentes y de cajas de unicel, la mitad de las plantas se colocó sobre una mezcla esterilizada de los sustratos agrolita y musgo *Sphagnum* (1:1), y la otra mitad sobre una mezcla no esterilizada. Las plantas de ambas tallas se aclimatizaron exitosamente en los dos tipos de contenedor, sobre la mezcla de sustratos esterilizada y sobre la no esterilizada.

INTRODUCCIÓN

México está considerado como el cuarto país con la mayor biodiversidad a nivel mundial en término de riqueza de especies, diversidad genética, tipos de vegetación y de germoplasma de plantas cultivadas (Soberón y Llorente, 1993). Su gran diversidad se atribuye a la combinación de diversos factores, entre ellos, su historia y variabilidad geológica, su posición geográfica, diversidad de altitudes, climas y orografía (Ramamoorthy *et al.*, 1993). Se estima que contiene en su territorio más del 12% de la biota del planeta (Toledo, 1994).

En cuanto a la cantidad de especies de orquídeas en el planeta se estima que existen entre 20,000 y 30,000 (Hágsater *et al.*, 2005), siendo probablemente la familia de plantas con flor más numerosa del planeta (Dressler, 1993). México tiene cerca de 1300 a 1400 especies (Hágsater y Soto, 1998), lo cual representa aproximadamente el 6% del total mundial (Espejo *et al.*, 2002) y de estas el 35% son endémicas (Soto, 1998).

Desafortunadamente esta riqueza de especies de orquídeas está en peligro en nuestro país debido a la destrucción y transformación de sus hábitat, el tráfico ilegal de especies, la depredación de ejemplares y el crecimiento urbano desordenado, factores que han conducido a que sean plantas muy vulnerables a la extinción (Sarmiento y Romero, 2000).

Uno de los métodos más adecuados para conservar las orquídeas es la micropropagación a través del cultivo de semillas y plántulas, utilizando la técnica de germinación *in vitro* sobre un medio de cultivo estéril suplementado con sales basales (minerales) y con una fuente de carbohidratos (sacarosa), para producir de cientos a miles de plantas y su posterior comercialización (Hicks, 2000; Hicks, 2005).

Sin embargo, las sales basales y el carbohidrato (sacarosa grado analítico) utilizados en la elaboración del medio de cultivo *in vitro* se obtienen a un costo elevado y se dificulta su adquisición en México, debido a que son productos de importación y los proveedores de estos insumos se localizan principalmente en lugares muy centralizados del país, por lo que sería conveniente sustituir estos productos por fertilizantes comerciales y por fuentes de

carbohidratos de uso casero como el azúcar refinada, que contiene más del 99% de sacarosa (Li Loo, 2002), y constituyen una alternativa económica y de fácil adquisición.

Al sustituir los componentes analíticos del medio de cultivo por productos comerciales, se podrá llevar a cabo la micropropagación de las orquídeas en los sitios donde habitan, incluso en comunidades rurales del país, al implementar el uso técnicas de cultivo casero *in vitro*, como las mencionadas por Barba y colaboradores (2001) y Hicks (2000), donde se sustituye equipo de laboratorio por equipo casero.

Debe fomentarse la micropropagación, el cultivo y la comercialización de especies de orquídeas nativas, en peligro de extinción o bien, que representen una fuente de recursos económicos importantes, principalmente para las comunidades rurales, quienes las extraen de su hábitat para su comercialización (Hágsater *et al.*, 2005). Tal es el caso de *Laelia anceps* subsp. *anceps*, una orquídea nativa de México (Halbinger y Soto, 1997) a la que se le ha dado un uso ornamental desde épocas prehispánicas y actualmente está expuesta a una sobreexplotación debido a sus flores llamativas. Es probable que dentro de algunos años esta situación la coloque en alguna categoría de riesgo de extinción (Halbinger y Soto, 1997; Hartman, 1992).

MARCO TEÓRICO

PANORAMA HISTÓRICO DEL USO DE LAS ORQUÍDEAS EN MÉXICO

En México desde las épocas prehispánica y colonial hasta la actual se reportan orquídeas con uso medicinal, artesanal, comestible, narcótico, saborizante, tóxico, adhesivo, con fines ceremoniales, mágico-religiosos, talismanes y afrodisíacos. Durante la época precortesiana eran utilizadas para elaborar la vestimenta de los emperadores aztecas, como las capas y mantos reales, penachos, adornos para brazos y piernas, también se confeccionaban abanicos y escudos ceremoniales (Téllez, 2003).

Bernal Díaz del Castillo, informó en sus cartas enviadas desde la gran Tenochtitlán conquistada, sobre estas bellas y raras flores que le fueron ofrecidas; cultivadas en los jardines de los reyes mexicanos en Xochimilco (Hartman, 1992).

La vainilla (*Vanilla planifolia*) era usada por altos funcionarios del Imperio Azteca añadida a la bebida popular llamada *Chocolatl* y al igual que las semillas del cacao (*Theobroma cacao*) se usó como moneda de cambio en el comercio, y fue muy importante para los aztecas y para los pueblos de las costas del Golfo de México (Hartman, 1992), actualmente es el aromatizante más importante de la industria alimentaria (Hágsater *et al.*, 2005).

En el siglo XVIII hubo grandes expediciones europeas a América y fue el principio de la era de las orquídeas como ornato casero. En 1730 llegaron los primeros grandes envíos de orquídeas silvestres al mercado europeo (Hartman, 1992); desde entonces, la constante sobreexplotación y la reducción de su hábitat han disminuido sus poblaciones.

La colecta de flores y plantas en la naturaleza debe ser detenida para mantener las poblaciones saludables y preservar estas plantas para el futuro (Halbinger y Soto, 1997). La Unión Mundial para la Naturaleza (IUCN por sus siglas en inglés) ubica 260 especies de orquídeas mexicanas en la lista de especies en riesgo de extinción (Soto y Hágsater, 1990); de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana, 181 especies están catalogadas en algún

status de conservación, 15 están en peligro de extinción, 58 amenazadas, 107 sujetas a protección especial y una se encuentra extinta en la naturaleza (NOM-059-ECOL-2001).

En particular las plantas del género *Laelia* eran exportadas en grandes cantidades hasta hace pocos años. Algunas están en vías de extinción por estas razones (Halbinger y Soto, 1997); *Laelia anceps* subsp. *dawsonii* está considerada en peligro de extinción por la NOM-059-ECOL-2001 y solo se conocen 12 individuos en estado silvestre; esta subespecie fue vendida a otros países en grandes cantidades con fines ornamentales.

Las laelias son las orquídeas mexicanas más típicas, se han cultivado por siglos en el país, especialmente por varios grupos indígenas, desde Chihuahua hasta Chiapas. Las plantas han adornado patios y las flores han sido ofrecidas durante siglos en celebraciones religiosas, bautizos, bodas y también para los difuntos (Hágsater *et al.*, 2005; Halbinger y Soto, 1997). En los mercados de la ciudad de México, Guadalajara, Morelia, Chilapa o Xalapa y muchos otros pueblos, las flores de plantas cultivadas y silvestres son vendidas a precios increíblemente bajos (Figura 1), tradicionalmente con los últimos 2 ó 3 pseudobulbos para prolongar su duración (Halbinger y Soto, 1997).



Fig. 1. Vendedor de Corpus (*Laelia speciosa*). Tomado de Hágsater *et al.*, 2005

FAMILIA ORCHIDACEAE

CARACTERÍSTICAS GENERALES

Ecológicas

Orchidaceae es una de las familias de plantas más grande y diversa (Dressler, 1990), con 900 géneros reconocidos, se trata de plantas herbáceas y perennes consideradas las más especializadas dentro de los vegetales (Barba *et al.*, 2002), entre otras cosas por que poseen adaptaciones para atraer, engañar y manipular a los insectos para lograr la polinización cruzada (Dressler, 1990).

Es una familia cosmopolita, que abarca desde Suecia y Alaska (EU) en el norte hasta Tierra de Fuego (Argentina) y la isla Mcquarie (Australia) en el sur (Figura 2), con la mayor abundancia de especies en lugares con una precipitación anual mayor a los 2.5 m (Dressler, 1990), habitan ecosistemas muy variados, como ríos, pantanos, selvas, bosques y desiertos, desde el nivel del mar hasta los 4,000 m (Barba *et al.*, 2002).

Las orquídeas mexicanas se localizan entre latitudes de 15° y 32° norte, en un país básicamente tropical con climas que van de húmedo tropicales a templados y alpinos debido a su variada topografía montañosa (Halbinger y Soto, 1997).

México se localiza en la intersección de dos dominios biogeográficos: el Neártico y el Neotropical, encontrando así especies de origen boreal comúnmente en las porciones montañosas y en las zonas bajas o medias, especies de afinidad tropical (Toledo, 1988).

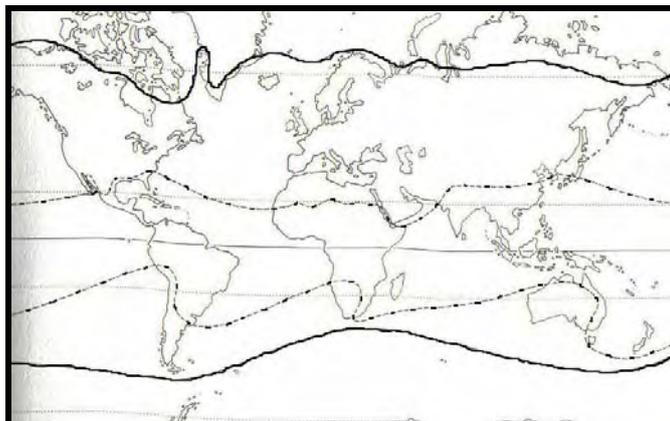


Fig. 2. Límites de distribución norte y sur aproximados de las orquídeas terrestres (líneas continuas) y de las epífitas (l. punteadas) (Tomado de Dressler, 1990).

Morfológicas

Con un número tan elevado de géneros y especies es normal que exista una gran variación en las formas y tamaños de estas plantas, las plantas adultas pueden alcanzar tallas menores a 1 cm, como en el caso de *Platystele jungermanniodes*, o más de 30 metros de largo, como las plantas del género *Vanilla* creciendo como trepadoras sobre los árboles (Dressler, 1990).

Flores

Las flores son sin duda la parte más atractiva de las orquídeas, suelen estar agregadas en racimos o panículas, aunque en ocasiones se producen de forma individual; las inflorescencias pueden originarse casi a cualquier altura del tallo o pseudobulbo, lo más común es que aparezcan ya sea en la base o en el ápice (Hágsater *et al.*, 2005).

El color de las flores que predomina es el amarillo, pero la mayoría de los colores están representados en casi todos sus tonos, desde el blanco níveo hasta el pardo oscuro casi negro (Barba *et al.*, 2002), pueden ser blancas, rosadas, lilas, rojas, amarillas, verdes y raramente azules (Ramírez, 1996), son de naturaleza zigomórfica (simétricas en un solo plano) (Hew y Yong, 2004) y su tamaño puede variar de 1 mm a 25.5 cm de diámetro (Barba *et al.*, 2002). La flor consiste de tres pétalos y tres sépalos, pudiendo estar modificados en gran medida uno o todos, comúnmente uno de los pétalos difiere en apariencia de los otros dos y es denominado labio o labelo (Fig. 3), que es el pétalo opuesto a la estructura reproductiva llamada columna o gimnostemo (Williams, 1982).

En la mayoría de las orquídeas el estambre y el pistilo se encuentran totalmente unidos en la columna. Parte del estigma, el rostelo, está involucrado usualmente en transferir el polen de una flor a otra, el cual se encuentra empaquetado en grandes masas llamadas polinios. Las flores comúnmente giran durante su desarrollo (resupinación), de manera que el labelo queda finalmente en la posición inferior de la flor (Dressler, 1990).

Tallos

La estructura básica del tallo de las orquídeas es comparable a una caña o carrizo y está formado por segmentos o entrenudos delimitados por nudos o anillos cicatrizales donde originalmente se insertaban hojas, vainas o escamas foliares (Hágsater *et al.*, 2005)

Los tallos pueden presentarse de forma horizontal sobre o en el sustrato, a este tipo de tallo se le conoce como rizoma y es una estructura compuesta de las secciones basales de brotes sucesivos, típicamente gruesos y duros; en algunas yemas axilares bien desarrolladas es donde se origina el nuevo brote. El rizoma, puede continuarse hacia la parte aérea de la planta, algunos autores llaman a esta sección tallo secundario, y se puede diferenciar en dos estructuras básicas de almacenamiento de agua y nutrimentos, entre las cuales no hay una clara diferencia, la primera es un tallo subterráneo denominado cormo y la segunda es el pseudobulbo (Figura 3), que se trata de un tallo aéreo engrosado presente comúnmente en las plantas epífitas (Dressler, 1990), que puede ser clasificado en homoblástico (muchos internodos) y heteroblástico (un solo internodo) (Hew y Yong, 2004).

Hojas

La mayoría de las hojas de las orquídeas son típicas de las monocotiledóneas, con muchas venas paralelas; las conexiones entre estas venas longitudinales son inconspicuas (Dressler, 1990), debido a la gran cantidad de especies las hojas presentan una amplia variedad de formas, tamaños y grosores. De acuerdo al grosor pueden clasificarse en delgadas y cuando los pseudobulbos están ausentes, pueden ser gruesas y funcionar como estructuras de almacenamiento (Barba *et al.*, 2002; Hew y Yong, 2004).

Raíces

El sistema radical entero está formado por raíces secundarias, que se originan del tallo, aunque varían mucho en grosor nunca son delgadas y fibrosas como las de los pastos y otras monocotiledóneas. En la mayoría de las raíces de orquídeas se presenta el velamen, que ha sustituido los pelillos radicales y se trata de capas superficiales de células muertas, esponjosas y blanquecinas (Dressler, 1990) que facilitan la absorción de agua y minerales; además las raíces pueden ser fotosintéticas, incluso en algunas especies toda la fotosíntesis se lleva a cabo en ellas, en general son gruesas, cilíndricas o aplanadas y en algunas terrestres pueden funcionar como estructuras de almacenamiento llamadas tuberoides (Barba *et al.*, 2002; Dressler, 1990).

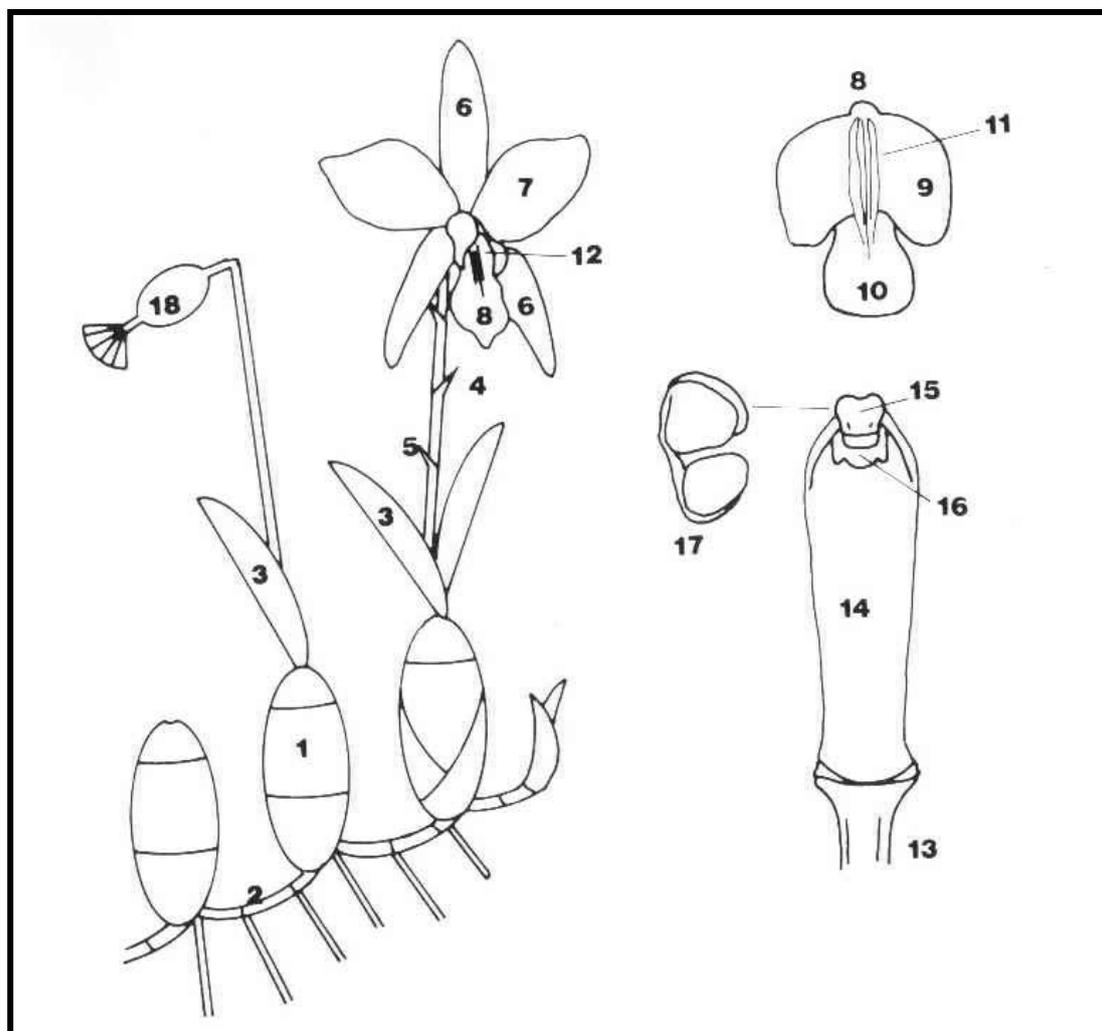


Fig. 3. Morfología de una *Laelia*. Tomado de Halbinger y Soto (1997)

1 pseudobulbos 2 rizoma 3 hoja 4 inflorescencia 5 bráctea 6 sépalos 7 pétalos
 8 labelo 9 lóbulos laterales del labelo 10 lóbulo medio del labelo 11 callo 12 garganta
 13 ovario 14 columna 15 antera 16 estigma 17 polinario 18 fruto o cápsula

FORMAS DE VIDA

Para fines prácticos las orquídeas son divididas usualmente en dos categorías: terrestres, que viven en el suelo, y epífitas, que viven sobre los árboles, aunque dentro de las últimas hay algunas que pueden crecer sobre rocas y son conocidas como litófitas (Fig. 4). Esta división no es exacta, dado que miembros del mismo género, e incluso individuos de la misma especie, pueden encontrarse creciendo en diferentes condiciones (Bristow, 1985).

Dentro del grupo de las terrestres se encuentran algunas especies que a lo largo de su vida no desarrollan hojas verdes para alimentarse y dependen de un hongo micorrízico que les provee el alimento a partir de la materia orgánica en descomposición que hay en el suelo, a este tipo de plantas se las conoce como saprófitas (Figura 4) (Bristow, 1985).

**LITÓFITA****EPÍFITA****TERRESTRE****SAPRÓFITA**

Fig. 4. Formas de vida de las orquídeas

GERMINACIÓN

En su hábitat

Las semillas de orquídea son muy pequeñas, pesan poco menos de una millonésima de gramo. Consisten generalmente de un embrión indiferenciado y simple, sin endospermo y cubierto por una testa (Arditti, 1967).

El proceso de germinación inicia cuando el embrión absorbe agua (imbibición), se hincha y ensancha asumiendo una forma esférica, con lo cual hace presión contra la testa hasta romperla. Las células inician la síntesis de clorofila, utilizan el alimento almacenado en la semilla; una vez iniciado el crecimiento, continúa con la absorción de materia orgánica del sustrato y comienza la diferenciación de los órganos, se desarrollan pelos absorbentes a partir de la epidermis (Shushan, 1959), el aumento de tamaño y la presencia de esta masa globular de células es conocido como protocormo, a partir de él emerge el primordio foliar y se desarrolla la primer hoja, tras la cual emergen una o dos hojas más y la primer raíz (Figura 5) (Arditti *et al.*, 1982; Baker *et al.*, 1987).

Las orquídeas poseen una tasa muy baja de germinación de aproximadamente el 1%, y solo alcanza la madurez cerca del 0.0005% (Barba, *et al.*, 2002), aún cuando en condiciones naturales las orquídeas producen frutos con una cantidad muy elevada de semillas (Stancato *et al.*, 1998); Benzing (1981), Arditti y Ernst (1986) reportan desde cientos o miles, hasta millones de semillas por fruto en diversas especies.

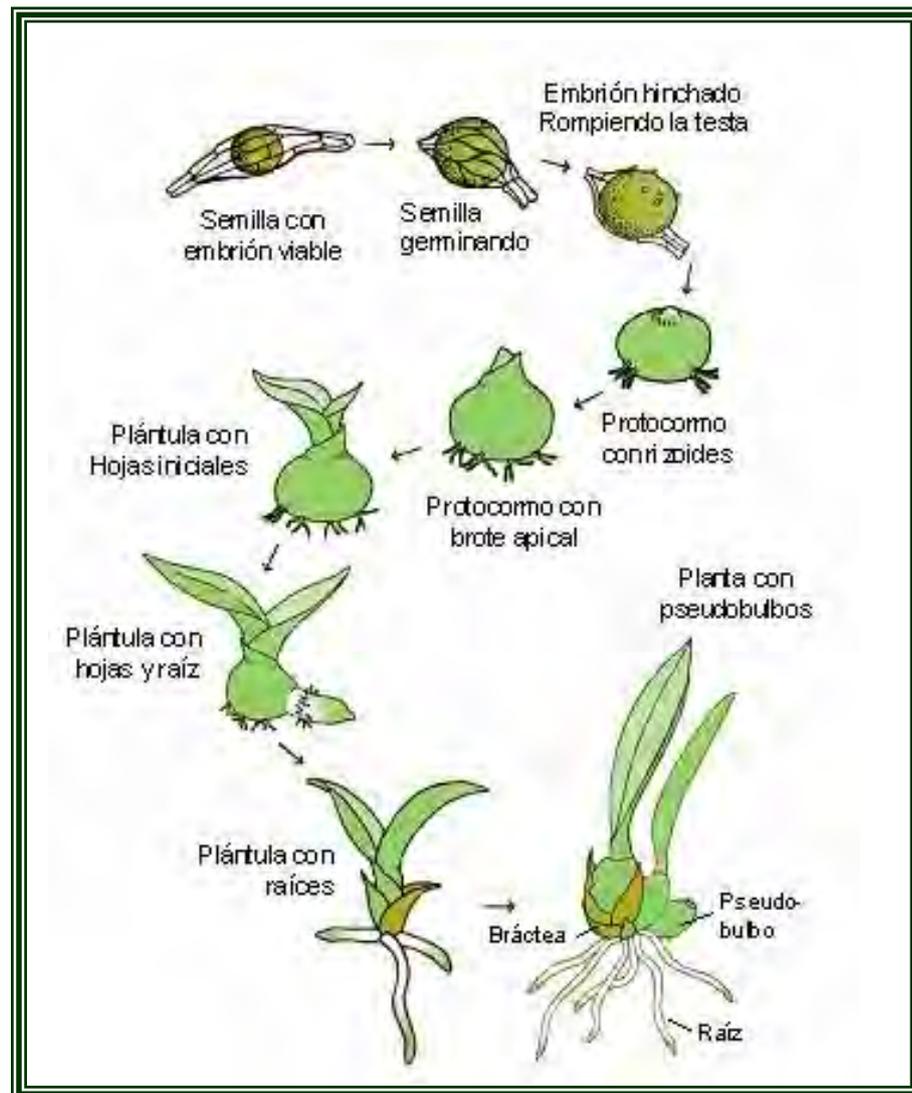


Fig. 5. Ciclo de vida de una *Laelia* según Seaton y Ramsay (2005)

Las principales reservas de muchas semillas de orquídeas son los lípidos, pero hay evidencia que indica que no poseen glicosomas, los organelos necesarios para el metabolismo de los lípidos (Hew, 1987), de manera que las semillas para germinar dependen de una asociación micorrízica (germinación simbiótica) en la que el hongo provee las enzimas necesarias para la degradación de los lípidos almacenados en la semilla (Stancato *et al.*, 1998), también abastece a la semilla con azúcares y nutrientes (McKendrick, 2000).

No se sabe exactamente qué es lo que extrae el hongo de la planta (Hicks, 2000). De hecho, la planta vive parasitando al hongo, lo cual Rasmussen (1995) reconoce como una relación micotrófica, más que una simbiosis.

La mayoría de los hongos relacionados en asociaciones micorrízicas con orquídeas pertenecen a los basidiomicetos. Los géneros de basidiomicetos incluyen *Ceratobasidium*, *Rhizoctonia*, *Sebacina*, *Thanatephorus*, y *Thulasnella* (Hadley, 1982). Arditti (1967) reporta la presencia de especies de *Corticium*, *Armillaria*, *Fomes* e *Hymenochaete* en la naturaleza y de especies de *Phytophthora*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Trichoderma* como iniciadores y promotores de la germinación. La relación con la planta es muy variable, pudiendo perderse completamente al madurar ésta, o bien ser cambiado por otro hongo en diferentes etapas de desarrollo (Hicks, 2000).

Adicionalmente son necesarias para la germinación condiciones microambientales adecuadas, como sustancias presentes en la corteza del árbol hospedero (Frei y Dodson, 1972), la especie adecuada de árbol hospedero, posición, altura, grosor del tronco o ramas, concentración de nutrientes, enfermedades, humedad y temperatura (Madison, 1977; Dressler, 1981); si todas estas condiciones no están presentes, las semillas simplemente no germinarán o las plántulas perecerán más adelante, de manera que un número extremadamente bajo llega a ser plantas adultas.

El recambio poblacional en las orquídeas es muy bajo, una planta tarda de uno a doce años según la especie para producir flores (Hernández, 1992), por ejemplo, las plántulas de *Laelia crispa* alcanzan una talla de 5 cm hasta los tres años en condiciones naturales (Warren, 1989). En un estudio con *Encyclia boothiana* en Florida se determinó que una colonia de 29 adultos produjo solo una plántula en el transcurso de un año (Stancato *et al.*, 1998), mientras que con *Laelia speciosa*, en Michoacán, en un periodo de un año se determinó que en dos poblaciones diferentes solo 14 de 94 individuos produjeron flor. Los frutos generados en la población número uno contaron con un promedio de 205,000 semillas por fruto y germinaron una de cada 20,750 (0.005 %); mientras que en la segunda población se observó un promedio de 1,006,000 semillas por fruto, con la germinación de una de cada 4,600 semillas (0.02 %) (Hernández, 1992).

NUTRICIÓN

Las plantas absorben los nutrientes a través de las raíces en sitios de intercambio en el suelo. En suelos fértiles, los nutrientes están disponibles para intercambio y absorción por parte de la planta mientras no se limite el agua (Poole y Sheenan, 1980).

Las orquídeas epífitas de bosques tropicales presentan problemas especiales con respecto a la asimilación de nutrientes y agua. Esta última es captada directamente de la lluvia. Las raíces proveen soporte a la planta, así como una extensa red de absorción de agua y la corteza del árbol también absorbe agua y la mantiene por una considerable cantidad de tiempo. Normalmente el humus es colectado entre los rizomas, raíces y hojas, y también funciona como un reservorio de humedad (Poole y Sheenan, 1980).

Cuando el agua está disponible, los nutrientes son absorbidos y el crecimiento de la planta es óptimo. El agua de lluvia es una fuente de nutrientes para las plantas epífitas, al acarrear partículas de polvo del aire y depositarlas sobre ellas, igualmente arrastra lixiviados de nutrientes minerales y orgánicos de las hojas de los árboles hospederos. La atmósfera es también una fuente excelente de nitratos, especialmente durante tormentas eléctricas (Poole y Sheenan, 1980).

Sin embargo la principal fuente de nutrientes es la materia orgánica en descomposición, gracias a la acción de bacterias que liberan compuestos en formas simples y asimilables para las plantas, y que es acumulada alrededor de las raíces; mientras la temperatura sea suficientemente cálida para mantener la actividad bacteriana, las orquídeas tienen una fuente continua de nutrientes (Mc Donald, 1999; Poole y Sheenan, 1980).

Los elementos esenciales para el desarrollo y metabolismo de las plantas son aquellos necesarios para que la planta pueda completar su ciclo de vida por ser constituyentes de alguna sustancia esencial o por participar en funciones vitales para la planta. Estos elementos se pueden clasificar en macro y micro elementos o nutrientes de acuerdo a las cantidades necesarias para las plantas de cada uno de ellos (Domínguez, 1989).

Dentro de los macro elementos se tienen al carbono (C), hidrógeno (H) y oxígeno (O) que son absorbidos por las plantas a través dióxido de carbono (CO₂) del aire o bien del agua (H₂O); y al nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), azufre (S), calcio (Ca) y magnesio (Mg) (Domínguez, 1989). En los micro elementos se incluyen al hierro (Fe), cobre (Cu), Zinc (Zn), manganeso (Mn), Molibdeno (Mo), Boro (Bo) y cloro (Cl).

TIPOS DE FERTILIZANTES

Con el fin de imitar la asimilación de nutrimentos en la naturaleza por parte de las orquídeas, al cultivarlas es necesaria la utilización de una fuente nutritiva artificial, como es el caso de los fertilizantes.

Los fertilizantes pueden ser orgánicos (derivados de plantas y animales), o inorgánicos (derivados de minerales) (Mc Donald, 1999). Los inorgánicos pueden contener al menos uno de los tres elementos principales o macroelementos (N, P, K), pudiendo contener además otros elementos como Mg, Bo, Zn, Fe. Los que contienen solo uno de los elementos se clasifican como simples y los que tienen dos o más como compuestos (García y Cuevas, 2000).

El contenido nutrimental de los fertilizantes comerciales compuestos se describe en la etiqueta con tres números básicos, los cuales indican los porcentajes de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K), de igual forma en caso de estar presentes en el fertilizante, se indican las cantidades de micronutrimentos, que también son necesarios para un crecimiento saludable y floración, pero la planta los asimila en mucho menor proporción (Mc Donald, 1999).

Pueden encontrarse en presentaciones sólidas, líquidas y gaseosas (García y Cuevas, 2000). Dentro de los fertilizantes sólidos es común encontrar dos tipos de presentaciones, los de disponibilidad controlada y los granulares.

En los de disponibilidad controlada, los gránulos de fertilizantes solubles se recubren con cierto tipo de membrana que regula la tasa en que la atraviesan las sales y quedan disponibles para las plantas. Producen interés principalmente por aspectos agronómicos, medioambiental e industrial. Con ellos es posible conservar la fertilidad del suelo y reducir los riesgos ambientales (Urbano, 1999).

Los granulares son fertilizantes complejos que contienen normalmente nutrimentos como N, P y K en forma soluble, lo cual genera que al diluirse y aplicarse presente mayor disponibilidad en la raíz de la planta. Hay una gran variedad de mezclas y proporciones, y son de bajo costo, sin embargo incrementan la contaminación ambiental por los lavados del sustrato (Urbano, 1999).

MÉTODOS DE FERTILIZACIÓN

Debido a que la raíz es el principal sitio de absorción de los nutrimentos por las plantas, es natural que la aplicación de los fertilizantes a través de ellas sea el método más generalizado. Adicionalmente, el costo de los fertilizantes de absorción radical es menor que los de absorción foliar; sin embargo presentan el gran inconveniente de la contaminación ambiental causada por los lavados de las aplicaciones al suelo (Acosta, 1991).

La absorción foliar es el paso de sustancias a través de la cutícula de las hojas, a pesar de la importancia de la raíz como zona de absorción, existen varios factores que han promovido la aplicación de nutrimentos por vía foliar, entre los que se puede mencionar, el hecho de permitir que la planta obtenga los nutrimentos cuando algunas condiciones del sustrato son adversas; el que en muchos casos la cantidad de nutrimentos a aplicar es tan pequeña que se prefiere una aplicación foliar más eficiente; que la respuesta de la planta sea rápida ya que se agrega la sustancia directamente al sitio de interés; y, cuando la demanda de nutrimentos es mayor a lo absorbido por la raíz (Acosta, 1991; Hew y Yong, 2004).

FERTILIZACIÓN DE ORQUÍDEAS

En la naturaleza las orquídeas obtienen sus nutrimentos de forma muy diluida, por lo cual resulta conveniente llevar a cabo su fertilización una vez por semana con la mitad de la concentración del fertilizante recomendada para otro tipo de cultivos (Mc Donald, 1999), cabe mencionar que la aplicación del fertilizante depende de la especie y del estado de desarrollo del ejemplar (Espinosa, 1997). La aparición de nuevo crecimiento señala usualmente capacidad de absorber humedad y nutrimentos disueltos a través del sistema radical, con un aumento de la asimilación de éstos conforme la planta crece. El período de máxima asimilación se da cuando el nuevo crecimiento está aparentemente cercano a la madurez. En esta etapa se puede incrementar hasta en 33% el tamaño del nuevo brote y se determina el número y calidad de flores (Rentoul, 1987)

Manrique (1993) encontró que las orquídeas necesitan pequeñas cantidades de fertilizantes, pues tienen un crecimiento lento, en los géneros *Cymbidium* y *Phalaenopsis* las aplicaciones de 100, 50 y 25 mg Kg⁻¹ de N, K y Mg respectivamente son óptimas, mientras que para *Cattleya* reporta un crecimiento óptimo utilizando 50 mg Kg⁻¹ de N, P y K.

El balance nutrimental que se elija dependerá del sustrato en que estén sembradas. Las que crecen en corteza necesitan más nitrógeno que fósforo y potasio, por que la corteza es descompuesta por bacterias, las cuales asimilan una gran cantidad de nitrógeno durante el proceso y dejan muy poco disponible para las orquídeas; en este caso se recomienda un balance 30-10-10 o 15-5-5. Para plantas que crecen sobre materiales relativamente estables como la fibra de helecho arborescente es conveniente utilizar un balance nutrimental equilibrado como 10-10-10, 20-20-20 o 23-19-17 (Espinosa, 1997; Mc Donald, 1999).

El balance nitrógeno-potasio es importante, altas concentraciones de N y bajas de K favorece el crecimiento vegetativo; bajos niveles de N y altos de K promueve el crecimiento reproductivo (Baker y Baker, 1998). Para estimular la floración cuando las plantas completan su crecimiento vegetativo, muchos cultivadores utilizan fertilizantes bajos en nitrógeno y altos en fósforo (10-30-20) (Mc Donald, 1999).

Sessler (1978) recomendó utilizar para los géneros *Cattleya*, *Epidendrum* y *Laelia* balances de 20-10-10, 20-20-20 (N-P-K), y 10-30-20 para la inducción de yemas florales y floración, mientras que para plantas que crecen sobre corteza es ideal el balance alto en nitrógeno 30-10-10.

Wang y Gregg (1994) al utilizar en tres concentraciones (0.25, 0.5 y 1 g L⁻¹) el fertilizante soluble Peters 20-8.6-16, observaron que con 0.25 y 0.5 g L⁻¹ se obtuvo la mejor respuesta en la emergencia de inflorescencias y tiempo para inducir la floración de *Phalaenopsis*, mientras que para la longitud del tallo floral fue en 1 g L⁻¹.

Espinosa y colaboradores (2000), al utilizar por separado los fertilizantes Peters y Orchids, con fórmulas 20-20-20, 19-31-17 y 15-30-15, en una concentración de 1.75 g en 4 L de agua combinados con micorrizas (CM) o sin ellas (SM), determinaron que los tratamientos 19-31-17 SM y 15-30-15 CM presentaron el mayor número de flores al momento del corte, y la mayor duración poscosecha fue de 38 días para el tratamiento 19-31-17 SM.

En estudios realizados con *Cymbidium hybridum*, el nitrógeno fue el factor más importante en el crecimiento de las hojas y el fósforo en la floración. El balance N-P-K (1-3.3-1.2) obtuvo la mayor floración (JiuZhou, 2005). Por su parte YunZhai y SiQing (2005) encontraron que el potasio es un factor que determina la brotación de hojas y número de brotes florales, mientras que el efecto del nitrógeno fue significativo en el desarrollo de pseudobulbos, calidad floral y número de flores por inflorescencia; el fósforo, aunado al potasio fue incidente en el número de flores.

ALTERACIONES NUTRICIONALES

La deficiencia de algún elemento puede desarrollarse cuando la disponibilidad de dicho elemento es más baja que el nivel requerido para el óptimo desarrollo de la planta. Las orquídeas son similares a otras plantas en sus requerimientos, con la excepción de que puede pasar mucho tiempo (incluso más de tres meses) para evidenciar una deficiencia mineral (Hew y Yong, 2004).

Las deficiencias pueden afectar a la planta entera, si son capaces de redistribuir los elementos que llegan a ser insuficientes, o bien, pueden afectar solo al nuevo crecimiento, cuando se trata de elementos que son difíciles de movilizar una vez que han sido incorporados a los tejidos (Cuadro 1).

El hierro (Fe), por ejemplo, es necesario para la síntesis de clorofila y a su vez para la fotosíntesis, así que cuando se presenta una deficiencia *in vitro* de este elemento, se observa inicialmente que los ápices de nuevas hojas dan la apariencia de ser quemados por el sol, o bien se observa clorosis intervenal, las hojas se observan de color amarillo o verde pálido mientras las venas se ven verdes; eventualmente el nuevo brote muere (Hicks, 2000).

Cuadro 1. Sintomatología de las deficiencias y excesos de macroelementos en orquídeas, según Baker y Baker (1998):

ELEMENTO	ALTERACIÓN	
	EXCESO	DEFICIENCIA
NITRÓGENO	Ennegrecimiento de las hojas	Clorosis en hojas viejas
	Crecimiento nuevo quebradizo	Coloración rojiza o purpúrea de las hojas
	Hojas de color verde muy oscuro	Poco crecimiento
	Nuevos brotes débiles y alargados	Ennegrecimiento de las hojas
FÓSFORO	Los niveles altos pueden elevar la susceptibilidad a enfermedades	La deficiencia resulta cuando no se fertiliza con la periodicidad recomendada
	Un exceso de P o K puede provocar síntomas de deficiencia de N	Hojas verdes con coloración rojiza-púrpura
	Hojas cloróticas, curvadas o abarquilladas que caen prematuramente	Defoliación prematura
	Las hojas presentan manchas cafés o cierto amarillamiento o blanqueado del tejido	Floración reducida
POTASIO	Reducido crecimiento, brotes débiles y alargados	Nuevos brotes alargados
	Hojas cloróticas, curvadas o abarquilladas que caen prematuramente	Quemaduras del margen de las hojas
	Las hojas presentan manchas cafés, amarillas o blancas	Clorosis, manchas necróticas, arrugamiento entre las venas y amarillamiento de los márgenes de las hojas
	Mayor susceptibilidad a enfermedades	Plantas enanas con entrenudos cortos

CONSERVACIÓN DE ORQUÍDEAS

La conservación de las orquídeas es una tarea intensa en países tropicales debido a su alta diversidad. El origen del problema es una creciente población humana que demanda cada vez mayor cantidad de recursos (Hágsater y Soto, 1998), lo cual está conduciendo a la extinción a muchas poblaciones y especies de orquídeas. La conservación de especies puede dividirse en dos vertientes, la conservación *in situ* y *ex situ*.

Conservación *in situ*

Es considerada como la estrategia de conservación más importante, debido a que permite mantener la variación genética de las especies, sus interacciones con otros organismos y la capacidad para seguir evolucionando. La permanencia de la mayor parte de las orquídeas en la naturaleza depende en gran medida de la conservación de grandes áreas con ambientes primarios (Hágsater *et al.*, 2005), con la colaboración de gobiernos, comunidades locales y organizaciones no gubernamentales (Hágsater y Soto, 1998).

En México se cuenta con un Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas (SINAP). Conformado por áreas que por su diversidad y características ecológicas son consideradas representativas de las regiones biogeográficas y ecológicas del país, así como de los ecosistemas más frágiles, que se pretende funcionen como ejes de conservación y desarrollo sustentable de la biodiversidad en sus tres niveles de organización, en particular de las especies catalogadas en alguna categoría de riesgo de extinción; proporcionando un campo propicio para la investigación científica, con la obtención y divulgación de conocimientos que permitan rescatar la biodiversidad nacional (CONABIO, 1998).

La conservación *in situ* de las orquídeas mexicanas y de la biota del país enfrenta graves problemas. Gran número de regiones prioritarias para la conservación de la biodiversidad no están ubicadas dentro del SINAP, ni son protegidas por pobladores locales, no existe una vigilancia adecuada de las ANP's y continuamente se registran acciones ilegales como la tala, extracción de especies, invasión de terrenos, ganadería y agricultura (Hágsater *et al.*, 2005).

Conservación *ex situ*

La conservación de especies *ex situ* es la que se desarrolla fuera de su hábitat natural. Se le considera como un complemento a los esfuerzos de conservación *in situ*, debido a que de esta manera es posible preservar parte de la diversidad genética y especies particulares que están en riesgo (CONABIO, 1998). Entre las orquídeas mexicanas *Laelia anceps* subsp. *dawsonii* y *Laelia gouldiana* solo se conocen en la actualidad debido a que han sido cultivadas por siglos en las villas indígenas. Recientemente se ha aceptado que la conservación *ex situ* es la única alternativa para la conservación de especies extremadamente amenazadas (Hágsater y Soto, 1998).

Las especies y genes pueden conservarse *ex situ* por distintos mecanismos, como son los bancos de germoplasma y las colecciones de tejidos o bien las colecciones de organismos vivos como zoológicos o jardines botánicos (CONABIO, 1998). Esta estrategia presenta dos variantes principales: la propagación y mantenimiento de las especies que no pueden subsistir en la naturaleza, y la propagación masiva y comercialización de la mayor cantidad de especies, con el fin de reducir y desalentar la colecta de plantas en su hábitat.

Desafortunadamente la conservación *ex situ* es costosa y enfrenta problemas complejos, sobre todo por que el objetivo principal es mantener una especie fuera de su hábitat por períodos muy largos y, a diferencia de la conservación *in situ*, es casi imposible preservar la variación genética y la capacidad evolutiva de las especies (Hágsater *et al.*, 2005).

MICROPROPAGACION

GERMINACIÓN *in vitro*

Una de las formas más adecuadas para conservar las orquídeas es a través de su cultivo *in vitro* y su posterior comercialización, como lo estableció Lewis Knudson, quien logró en 1922 la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de orquídea, al sembrarlas en un medio de cultivo estéril con azúcar (sacarosa o azúcar de mesa), para reemplazar los carbohidratos complejos proporcionados por el hongo; y sales minerales para proveer los otros elementos esenciales requeridos para la nutrición de la planta. Demostró que la presencia de azúcares fue la responsable de la germinación *in vitro* (Hicks, 2005; Hicks, 2000).

El desarrollo de plántulas de orquídeas a través de la germinación *in vitro* es un proceso muy común actualmente, produciéndolas en gran número (Stancato *et al.*, 1998), con un crecimiento más rápido que en condiciones naturales (Warren y Miller, 1993) y variabilidad genética mucho mayor que la obtenida por la micropropagación clonal (Stenberg y Kane, 1998).

La variabilidad genética es deseable en caso de una reintroducción a sus áreas naturales, además de la posibilidad de proveer de ejemplares al mercado de plantas de ornato y de plántulas a las poblaciones rurales que las colectan, consiguiendo cultivarlas en sus áreas de distribución natural y comercializarlas al madurar.

Las orquídeas germinan asimbióticamente *in vitro* después de la imbibición, forman un cuerpo esférico denominado protocormo, a partir de cuya base surgen rizoides y a continuación primordios de hojas y raíces, todo lo cual permite distinguir etapas bien definidas que se usan en el cálculo de índices de crecimiento (Arditti y Ernst, 1984).

CULTIVO *in vitro* COMO MÉTODO DE CONSERVACIÓN

El cultivo *in vitro* de orquídeas puede ser una herramienta útil en la conservación de orquídeas, particularmente aquellas en peligro de extinción. Algunos ejemplos de esto son los siguientes:

Laelia anceps subsp. *dawsonii* ha sido propagada en forma masiva y hay una gran cantidad de clones bajo cultivo a pesar que solo se conocen 12 individuos en estado silvestre. *Paphiopedilum xerophyticum* se encuentra en la misma situación (Hágsater y Soto, 1998).

En la de la Reserva Orquideológica del Pahuma en Ecuador se cultiva *in vitro* orquídeas nativas del lugar con el objetivo de conservar estas especies al reintroducirlas a su ambiente o bien obtener fondos a través de la venta de semillas y de plántulas *in vitro* (McKendrick, 2000)

En México, específicamente en la región de los Tuxtlas, Veracruz, un grupo interinstitucional e interdisciplinario estableció un laboratorio de cultivo *in vitro* para producir orquídeas del lugar (en alguna categoría de riesgo de extinción), dichas plantas son donadas a tres comunidades de la zona para llevar a cabo su cultivo en invernadero y posterior comercialización, con el compromiso de las comunidades de reintroducir un porcentaje de estas plantas a su medio (Aceves, 2000).

En valle de Macae, Brasil existe igualmente un proyecto en el que se realiza el ecoturismo y la producción *in vitro* de orquídeas nativas con fines comerciales y de conservación y han logrado reestablecer plantas de *Laelia cinnabarina* y *L. pumila* cultivadas *in vitro* hasta colonias en floración en lugares donde habían desaparecido (Warren, 1989).

MEDIO DE CULTIVO

Se han formulado una gran cantidad de medios de cultivo, los cuales generalmente están constituidos por sales inorgánicas; sustancias orgánicas que incluyen carbohidratos, fitohormonas, vitaminas y aminoácidos; compuestos naturales de origen vegetal o animal, como el agua de coco, jugo de tomate y pulpa de plátano; y agua destilada, para disolver los componentes anteriores.

La consistencia del medio puede ser líquida o semisólida, utilizando agar como gelificante. Cada especie vegetal tiene necesidades nutricionales específicas; sin embargo, un medio de cultivo utilizado ampliamente en el cultivo *in vitro* es el Murashige & Skoog (Barba *et al.*, 2001; Arditti y Ernst, 1993).

Las sales inorgánicas se dividen en macro y microelementos (o nutrimentos). Las primeras son requeridas por la planta en grandes cantidades e incluyen al Ca, Mg, N (suplementado como amonio, nitrato o raramente urea), P (principalmente como PO₄), K, Fe, y S (usualmente como SO₄).

Dependiendo del medio, varias sales pueden ser utilizadas para suplementar el mineral, por ejemplo, el potasio puede adicionarse como KNO₃, KH₂PO₄, K₂HPO₄ o KCl entre otros; el nitrógeno puede agregarse como KNO₃, NH₄NO₃, Ca(NO₃), (NH₄)₂SO₄, en forma de otras sales, o bien como urea (Barba *et al.*, 2001; Arditti y Ernst, 1993).

Los microelementos se requieren en pequeñas cantidades, como el Mn, Bo, Cu, Zn, Mo y Cl.

SALES BASALES EMPLEADOS EN EL GÉNERO *Laelia* Y GÉNEROS AFINES

Las mezclas de sales minerales (o sales basales) utilizadas comercialmente y recomendados para la germinación y desarrollo *in vitro* de plántulas de orquídeas del género *Laelia* y géneros afines son:

El Knudson C (KC) para *Laelia purpurata* (Stancato *et al.*, 1998), *Laelia albida* (Santos *et al.*, 2005), *Encyclia boothiana* (Stenberg y Kane, 1998);

El Murashige y Skoog (MS) para *Brassolaeliocattleya* y *Sophrolaeliocattleya* (Adelberg *et al.*, 1997), *Laelia speciosa* (Barrera *et al.*, 2005), *Laelia flava* (Moraes *et al.*, 2005), *Laelia autumnalis* (Sierra, 2006), *Encyclia boothiana* (Stenberg y Kane, 1998), *Encyclia cordigera*, *Epidendrum stamfordianum*, *Epidendrum nocturnum* (Aceves, 2000) y *Epidendrum radicans* (Pateli, 2003).

Plántulas de *Cattleya dowiana* var. *aurea* fueron germinadas en el medio Vacin & Went (VW) (Butcher y Marlow, 1989).

Por otro lado, Ichihashi (1979) utilizó los medios de cultivo KC, VW, Kano, Thompson, y dos medios probados en *Bletilla striata* para inducir la germinación de *Laelia anceps*; luego de 24 semanas de cultivo encontró que las plantas crecieron uniformemente y de forma normal sobre el medio Kano.

FERTILIZANTES COMO SUSTITUTOS DE LAS SALES BASALES DEL MEDIO DE CULTIVO *in vitro*

Los medios de cultivo usados para la germinación asimbiótica están compuestos de sales basales y azúcares, entre otros componentes. Las sales están conformadas por cationes (calcio, magnesio, amonio, etc.) y aniones (cloruro, nitrato, sulfato, etc.).

Por su parte, los fertilizantes balanceados también están constituidos por sales minerales, las cuales coinciden parcialmente con las sales presentes en los medios de cultivo *in vitro*, de manera que pueden ser utilizadas para sustituir los componentes normalmente usados en el cultivo *in vitro*. Es posible elaborar medio para germinación de semillas de orquídea a partir de fertilizantes, azúcar y algunos extractos, como plátano y piña. Uno de los fertilizantes que han dado buenos resultados adicionado con plátano es: Peters 20-20-20 con microelementos (1 gr L⁻¹ de medio) y Peters 12-36-14 (1.5 gr L⁻¹), en el último caso acompañado también de azúcar de mesa (Hicks, 2000). Yanagawa y colaboradores (1995), Arditti y colaboradores (1982), Stoutemeyer y Cooke (1989) son otros autores que reportan resultados satisfactorios en el uso de fertilizantes como sustitutos en el medio de cultivo.

Do Valle y Tadeu (2005) usaron fertilizantes como sustitutos en el cultivo *in vitro* de las orquídeas *Catasetum fimbriatum* y *Cyrtopodium paranaensis* con balances N-P-K (10-5-5) y (10-30-20) en concentraciones de 2 mL L⁻¹ y 3 g L⁻¹ de medio respectivamente. Sembraron las semillas de estas especies en el medio KC para lograr la germinación; una vez germinadas las semillas, transfirieron los protocormos a los medios MS al 100 %, MS al 50 y 25 % de sus macronutrientes, KC, VW y las dos formulaciones de fertilizantes, todos los tratamientos suplementados con 30 g de sacarosa y 6 g L⁻¹ de agar.

La importancia del uso de estos medios es obvia en países en desarrollo en los que las formulaciones comerciales realmente no están disponibles (Hicks, 2000). Behar (1998) notó la importancia del desarrollo de este tipo de medios para satisfacer la necesidad de laboratorios cercanos a los hábitats nativos de la mayoría de las orquídeas.

CARBOHIDRATOS EMPLEADOS EN EL MEDIO DE CULTIVO *in vitro*

La fuente de carbono y energía para las plántulas *in vitro* es suplementada en forma de carbohidratos, la glucosa se ha utilizado para este fin en el cultivo de monocotiledóneas y de forma menos frecuente se han utilizado fructosa y almidón (Hartman *et al.*, 1990).

El carbohidrato más utilizado para la elaboración del medio de cultivo es la sacarosa (Hazarika, 2003; Hartman *et al.*, 1990). Harrison y Arditti (1978) observaron que las plántulas de *Cattleya aurantiaca* desarrollaron raíces hasta que se suplementó sacarosa al medio de cultivo luego de 100 días de cultivo.

La sacarosa es un disacárido compuesto de los monosacáridos alfa glucosa (también conocida como dextrosa) y fructosa (conocida como levulosa). Cuando la sacarosa es esterilizada en el autoclave, se hidroliza en fructosa y glucosa, particularmente en una solución ácida (Hicks, 2000; Hew y Yong, 2004). Kishi y Tagaky (1997) encontraron que al esterilizar con el autoclave el medio de cultivo, aproximadamente 20 % de la sacarosa se descompuso en glucosa y fructosa.

Azúcares caseros

La palabra azúcar o azúcares se utiliza para designar a todos los hidratos de carbono; aunque coloquialmente se le conoce como azúcar, azúcar común o azúcar de mesa al endulzante de origen natural, sólido, cristalizado, constituido principalmente de cristales sueltos de sacarosa (Wikipedia, 2007).

La sacarosa es un disacárido que se obtiene principalmente de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) o de la remolacha azucarera (*Beta vulgaris*) (Li Loo, 2002).

El proceso de refinación del azúcar se divide en dos etapas, la primera se denomina obtención de azúcar de caña, en la cual el jugo obtenido de la molienda de la caña de azúcar se concentra y cristaliza al evaporarse el agua por calentamiento. En esta etapa se obtiene el azúcar crudo, rubio y la melaza, y la segunda es la refinación propiamente dicha, de la que se obtiene azúcar refinada (Li Loo, 2002).

El azúcar comercial generalmente es sacarosa de diferentes grados de pureza. Normalmente la refinación se expresa visualmente a través del color, que está dado principalmente por el porcentaje de sacarosa que se ha extraído (Wikipedia, 2007):

Azúcar No Refinada o azúcar Moreno. También llamado “negro” o “crudo”, se obtiene del jugo de caña de azúcar sin refinar ni procesar, sólo cristalizado. Debe su color a una película de melaza que envuelve cada cristal. Tiene entre 96 y 98 grados de sacarosa. Su contenido mineral es ligeramente superior al azúcar blanco, pero muy inferior al de la melaza.

Azúcar Rubio. Menos oscuro que el moreno y con mayor porcentaje de sacarosa.

Azúcar Blanco. 99.5% de sacarosa. También denominado azúcar sulfatado.

Azúcar Refinado o extrablanco. Azúcar altamente puro, entre 99.8 y 99.9 % de sacarosa. Se ha cristalizado dos veces. En el proceso de refinamiento se desechan algunos de sus nutrimentos complementarios, como minerales y vitaminas.

Piloncillo.

Es un alimento típico en países de Latinoamérica, donde recibe los nombres de panela, raspadura, atado dulce, chancaca, empanizao, papelón o piloncillo. También se produce en países asiáticos como la India y Pakistán, donde se le conoce como gur o jagery.

Se utiliza principalmente para endulzar platillos y postres que no exijan un tono transparente perfecto y como un edulcorante sucedáneo del azúcar en zonas rurales (Castedo, 2007).

En México se le da el nombre de piloncillo a los azúcares sólidos de caña no refinados obtenidos de la evaporación de los jugos de la caña cocidos a altas temperaturas hasta formar una melaza bastante densa, esta se deja secar hasta solidificarse y cristalizar. También se le denomina azúcar cruda, sin refinar, sin centrifugar, habitualmente vendido a granel como bloques pequeños de forma cónica truncada de color ocre claro a oscuro (Castedo, 2007).

Además de sacarosa presenta significativos contenidos de glucosa, fructosa, grasas, proteínas, minerales y vitaminas como el ácido ascórbico. Contiene cantidades notables de sales minerales, las cuales son cinco veces mayores que el del azúcar moscabado y 50 veces más que las del azúcar refinado. Entre los principales figuran Ca, K, Mg, Cu, Fe y P, como también trazas de fluor (F) y selenio (Se) (Castedo, 2007).

ACLIMATIZACIÓN DE PLANTAS

La transferencia de plantas de condiciones asépticas *in vitro* a condiciones ambientales *ex vitro*, es un paso crítico, que debe realizarse adecuadamente para evitar la pérdida de gran cantidad de plantas, pudiendo ser más del 50% durante los primeros seis meses (Barba *et al.*, 2001; Klerk, 2000; Uosukainen *et al.*, 2000). Las causas principales que provocan esta pérdida son la infección por microorganismos, mala nutrición y deshidratación de las plantas.

Las plantas obtenidas bajo condiciones *in vitro* difieren morfológicamente de aquellas generadas bajo condiciones ambientales naturales. Poseen generalmente una cutícula escasamente desarrollada debido a la alta humedad relativa (90-100%) generada *in vitro*, hojas más delgadas y blandas, de tal forma que al trasplantarlas a condiciones ambientales, pierden agua más rápidamente que las plantas normales. Otras causas de deshidratación son el deficiente control de la función estomática y la carencia de raíces capaces de funcionar adecuadamente en el suelo, por lo cual se marchitan y mueren al no poder sustituir el agua perdida por las hojas (Hew y Yong, 2004; Barba *et al.*, 2001; Pierik, 1990).

Adicionalmente, las plantas son fotosintéticamente poco activas, ya que el medio de cultivo le proporciona el carbono necesario para su desarrollo en forma de azúcares (Hew y Yong, 2004; Barba *et al.*, 2001). El paso crítico del trasplante es la inducción del cambio fisiológico para que la planta fotosintetice adecuadamente, regule la transpiración y el funcionamiento del sistema radical sea eficiente. Este cambio se da en las primeras dos a cuatro semanas después de la extracción de las plantas (Barba *et al.*, 2001; Pierik, 1990).

Para favorecer este cambio es necesario evitar infecciones por bacterias y hongos, así que previamente se debe eliminar el agar adherido en las raíces de las plantas, aplicar fungicida como medida preventiva, utilizar un sustrato esterilizado y llevar controles fitosanitarios, además se deben sembrar las plantas en un sustrato que le brinde una adecuada retención de humedad y aireación, y en caso de trasplantarlas a un ambiente con menos humedad que la encontrada *in vitro*, será necesario disminuir gradualmente la humedad relativa, así como regular la radiación lumínica (Pierik, 1990).

Sustratos y Mezclas

Un sustrato es un material sólido distinto del suelo, puede ser natural o sintético, funciona como soporte para la planta y puede intervenir o no en la nutrición (Maroto, 1990). Diversos sustratos y mezclas son utilizados para la germinación y enraizamiento de plantas, tales sustratos deben tener características apropiadas para el adecuado desarrollo de las plantas, como son:

- El sustrato debe tener suficientemente firmeza y densidad para mantener las plantas o semillas en su lugar, con un volumen constante sea en seco o mojado; mantener suficiente humedad para que el riego no sea tan frecuente y ser suficientemente poroso para que el exceso de agua sea drenado, permitiendo un acceso adecuado de oxígeno a las raíces; estar libre de semillas, nemátodos y otros patógenos; no tener un elevado nivel de salinidad y poder esterilizarlo sin dañarse y finalmente, debe proveer nutrimentos adecuados cuando las plantas permanezcan en él durante un largo período, aunque esto puede remediarse con la aplicación frecuente de fertilizantes (Hartman *et al.*, 1990; Llurba, 1997).

Algunos sustratos comúnmente empleados son la arena, carbón activado, tezontle, vermiculita, piedra pómez, agregados plásticos sintéticos, corteza y viruta de árbol, composta, turba, musgo *Sphagnum* y agrolita (Hartman *et al.*, 1990).

La agrolita es un material silíceo blanco grisáceo con pH de 6 a 8, de origen volcánico; es calentada a temperaturas de cerca de 760° C, con lo cual se esteriliza y las partículas se expanden por el agua que contienen, resultando en granos porosos muy ligeros, con un peso de 0.084 a 0.134 g/cm³, que mantienen de tres a cuatro veces su peso

en agua y es muy utilizada para incrementar la aireación en mezclas de sustratos; es comúnmente utilizado como un medio de enraizamiento combinado con musgo *Sphagnum*.

El musgo *Sphagnum* es la porción viva o deshidratada de plantas de pantano del género *Sphagnum*, es relativamente estéril, ligero en peso, tiene una gran porosidad al aire, puede absorber de 10 a 20 veces su peso en agua, y absorbe bien las materias nutritivas. Contiene cantidades de nutrimentos muy bajas y presenta un pH de 3.5 a 4. Adicionalmente contiene una o varias sustancias fungicidas (Hartman *et al.*, 1990; Terres *et al.*, 1997).

Se ha reportado el uso de diversos sustratos y mezclas para la aclimatización de orquídeas, Butcher y Marlow (1989) emplearon una mezcla de corteza, carbón y vermiculita para trasplantar plántulas de *Cattleya dowiana* var. *aurea* de doce meses; Stenberg y Kane (1998) experimentaron con tres tipos de sustratos, Metro Mix 300, corteza de abeto (CZ), musgo *Sphagnum* (S) y la mezcla de CZ-S en una proporción 3:1 para plántulas de *Encyclia boothiana*, y el mejor resultado obtenido, considerando la apariencia de las plántulas, mayor talla, peso fresco, número de hojas y raíces, fue con S.

Sierra, en 2006, utilizó para plántulas de *Laelia autumnalis* seis mezclas con los sustratos Agrolita (A), *Sphagnum* (S), Carbón Activado (CA) y Tezontle (T) en las siguientes proporciones: A-S (2:1), CA-S (2:1), T-S (2:1), CA-A-S (1:1:1), CA-T-S (1:1:1), y T-A-S (1:1:1). Reportó que la mortalidad más baja, mayor peso fresco, longitud de hojas y de raíces se obtuvo en A-S (2:1).

Lo y colaboradores (2004) emplearon musgo *Sphagnum*, rizomas de helecho arborescente y la mezcla de ambos para *Dendrobium tosaense*; resultando que el musgo *Sphagnum* y la mezcla con helecho arborescente fueron los sustratos más adecuados para aclimatizar.

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Laelia anceps* Lindl

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Asparagales
Familia	Orchidaceae
Subfamilia	Epidendroideae
Tribu	Epidendreae
Subtribu	Laeliinae
Género	<u><i>Laelia</i></u>

DESCRIPCIÓN

Laelia anceps subsp. *anceps*

Es una planta epífita de 25 a 50 cm de altura, tiene un rizoma alargado de 3 a 4.5 cm de longitud con 5 o 6 internodos; los pseudobulbos son elipsoide-ovoides, cada uno con hoja solitaria oblongo-elíptica a lanceolada de color verde, de 12.5-23.3 cm de longitud.

La inflorescencia mide 25-75 cm de longitud con un racimo de 2-3 flores comúnmente y muy raramente más de 5 flores, las cuales son grandes y muy vistosas, de 7 a 12 cm (Figura 6), usualmente de color rosa púrpura y el labelo púrpura oscuro, a la mitad del cual se observa un callo amarillo con tres crestas terminales, durante días soleados las flores emiten una fragancia agradable.

Es conocida comúnmente con los nombres de “Vara de San Diego”, “flor de San Miguel” y “flor de Todos Santos” (Halbinger y Soto, 1997).

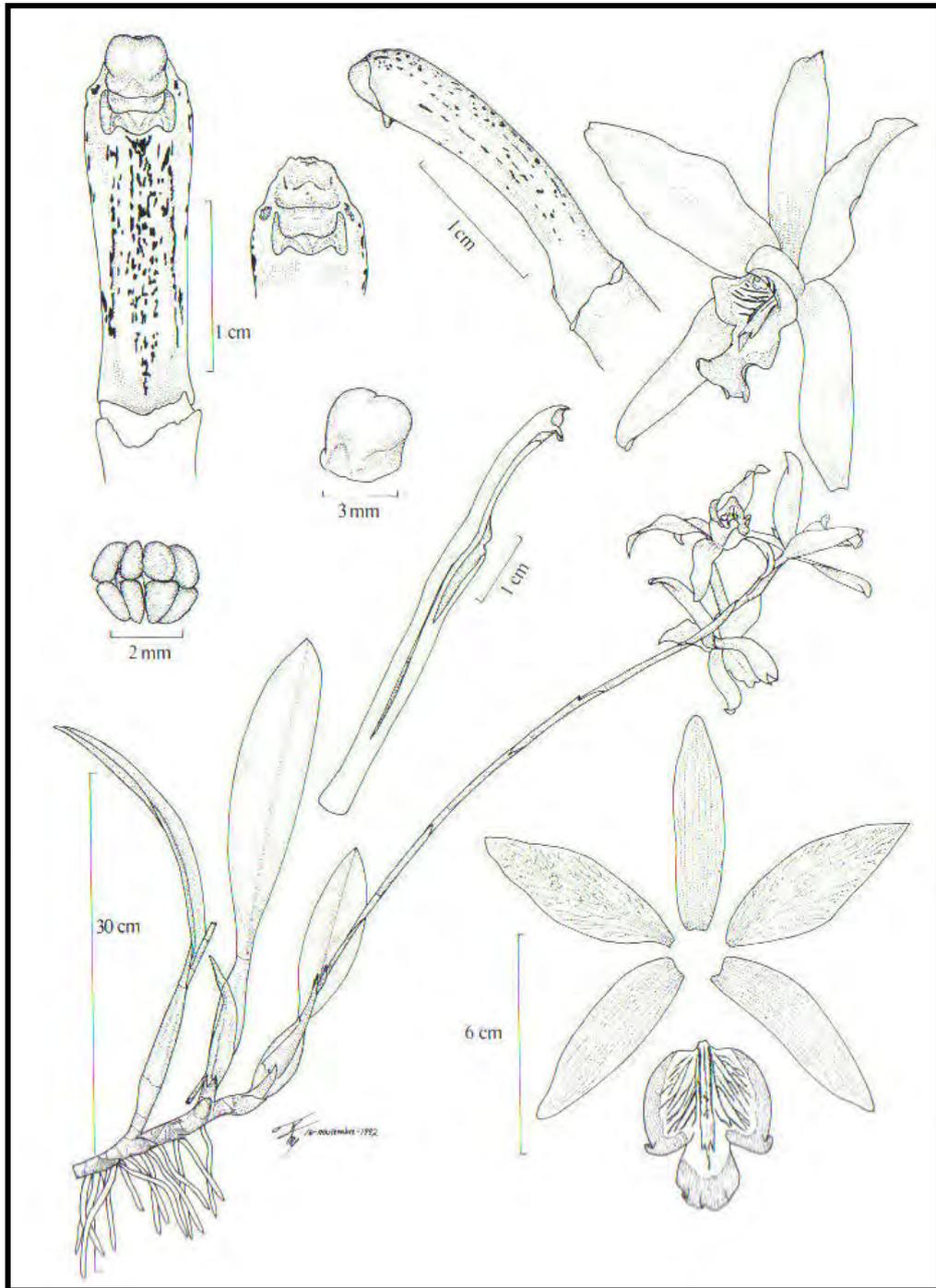


Fig. 6. *Laelia anceps* subsp. *anceps*. Tomado de Halbinger y Soto, 1997

DISTRIBUCIÓN DE *L. anceps* subsp. *anceps*

Laelia anceps Lindl. se distribuye en la Sierra Madre Oriental y en la Altiplanicie Central de Chiapas. La subespecie *anceps* puede ser encontrada en la vertiente del Golfo de México; en los estados de Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Hidalgo, Querétaro, Puebla, Veracruz, Oaxaca, y Chiapas (Figura 7); y también en Guatemala y Honduras (Halbinger y Soto, 1997).

Habita bosques de encino cálidos (*Quercus conspersa*, *Q. oleoides*, *Q. laeta*), generalmente con especies de árboles tropicales deciduos (*Acacia*, *Erythrina*) preferiblemente en altitudes de 900 a 1500 metros con una precipitación anual de 1200 a 2100 mm. Florece de octubre a diciembre.

A pesar de que las poblaciones de *Laelia anceps* subsp. *anceps* en general son pequeñas, no está en alguna categoría de riesgo y hay enormes poblaciones en Veracruz, San Luis Potosí y Tamaulipas. Sin embargo la planta es escasa y se conoce solo en pequeñas localidades en Chiapas y Oaxaca (Halbinger y Soto, 1997), y a lo largo de toda su distribución en la República, se encuentra sometida a una presión de colecta muy grande debido a lo atractivo de sus flores, comercializándose no solo las flores, sino también la planta completa, lo cual está provocando la disminución sistemática de sus poblaciones y de seguir así, es muy probable que en el mediano plazo se catalogue en alguna categoría de riesgo de extinción.

Fig. 7. Distribución de *L. anceps* subsp. *anceps* en México



HIPÓTESIS

Con base en los medios de cultivo utilizados *in vitro* para orquídeas, donde se emplean sales minerales y sacarosa grado analítico, y dado que los fertilizantes comerciales también contienen sales inorgánicas y los azúcares de uso casero contienen sacarosa en diferentes grados de pureza, es posible sustituirlos como fuente de macro y micronutrientes y como fuente de carbohidratos para la propagación *in vitro* de la orquídea *Laelia anceps* subsp. *anceps*, donde se espera que el desarrollo de plántulas sea similar al que se obtiene con los medios basales comerciales para establecer un protocolo útil en la propagación de *L. anceps* subsp. *anceps*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Establecer el uso de fertilizantes comerciales y azúcares de uso casero como sustitutos de componentes de grado analítico en la propagación *in vitro* de *Laelia anceps* subsp. *anceps* (Orchidaceae).

Objetivos particulares

- Evaluar el desarrollo de la germinación *in vitro* de semillas de *Laelia anceps* subsp. *anceps* en medios nutritivos con sales basales MS y KC para la obtención de plántulas.
- Determinar el medio nutritivo con sales basales (MS) o con fertilizantes (Peters, Floren o Folifértil) que favorezca el mejor desarrollo *in vitro* de plántulas.
- Determinar el efecto de diversos sustitutos de sacarosa (piloncillo, azúcar refinada y azúcar no refinada) en el medio de cultivo con sales basales MS sobre el desarrollo *in vitro* de plántulas.
- Establecer la aclimatización de las plántulas obtenidas *in vitro* a condiciones controladas.
- Establecer un protocolo de germinación y desarrollo de plántulas de *Laelia anceps* subsp. *anceps*.

MATERIAL Y MÉTODO

MATERIAL BIOLÓGICO.

Se utilizaron semillas de *Laelia anceps* subsp *anceps*, las cuales se obtuvieron en el mes de marzo de 2005 a partir de tres cápsulas maduras dehiscentes, provenientes del norte del estado de Puebla. Se almacenaron en refrigeración a 4°C dentro de frascos viales, para conservar su viabilidad.

VIABILIDAD.

Se tomó una muestra de semillas (entre 100 y 200 aprox.) de tres cápsulas *Laelia anceps* subsp. *anceps* con ayuda de una espátula y cada lote se sumergió en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0.55% v/v, con una gota de jabón líquido (para romper la tensión superficial de las semillas) con el fin de desinfectarlas y evitar que la actividad metabólica de microorganismos interfiriera con la prueba de viabilidad; se agitaron durante 10 min. para que las semillas se precipitaran al fondo de la solución, lo cual indicó que la solución actuó sobre la cubierta de la semilla.

Enseguida se decantó la solución de cloro y se realizaron 3 enjuagues con agua destilada estéril, las semillas se mantuvieron en el último enjuague por 24 horas; transcurrido el tiempo se decantó el agua destilada y se añadió una solución de 2,3,5 cloruro de trifenil tetrazolio (TTC) al 1%; el TTC estuvo en contacto con el embrión de la semilla, durante 48 horas en obscuridad total hasta que las semillas se observaron teñidas; se tomaron algunas gotas con semillas del fondo de la solución con ayuda de una pipeta Pasteur y se dispersaron sobre un pedazo de papel filtro de 3 cm de diámetro subdividido en 16 cuadrantes de 0.5 por 0.5 cm y se observaron bajo el microscopio estereoscópico. El embrión vivo se tiñó de un color rojo o naranja y se registró el número de semillas viables y no viables, con lo cual se determinó el porcentaje de viabilidad de cada uno de los lotes. Las semillas provenientes de la cápsula con un mayor porcentaje de viabilidad fueron utilizadas para la siembra *in vitro*.

ETAPA DE GERMINACIÓN.

MEDIOS DE CULTIVO.

Con sales basales.

Se utilizaron los medios de cultivo Murashige y Skoog (MS) y Knudson C (KC) (Cuadro 2), para lo cual se emplearon los medios nutritivos con sales basales comerciales MS (Sigma, 2006 Clave M 5524) y KC (Sigma, 2006 clave K 4003). Las sales se disolvieron en agua destilada.

El medio MS se adicionó con vitaminas y ambos medios se suplementaron con sacarosa grado analítico; el pH en cada uno de los medios se ajustó, utilizando NaOH 1N ó HCl 1N, en 5.7 para MS y en 5.6 para KC. Finalmente se agregó como gelificante Agargel (Sigma, 2006 clave A 3301) y enseguida se calentó cada uno de los medios de cultivo dentro del microondas hasta que el Agargel se disolvió completamente.

Se vaciaron 20 mL de medio en cajas de Petri de 6cm de diámetro, se taparon y esterilizaron en el autoclave a 20 libras de presión y 120°C de temperatura durante 15 minutos; las cajas se utilizaron durante los primeros estadíos en la germinación de las semillas.

Una vez que las plántulas se desarrollaron hasta alcanzar la altura de las cajas de Petri, fue necesario trasplantarlas a frascos de vidrio de 100 mL de capacidad, los cuales contenían 30 mL de medio, cada uno.

La germinación de las semillas *in vitro* se comparó al utilizar cuatro tratamientos (Cuadro 3), cada uno con diez repeticiones. Se consideró como una repetición, una caja de Petri con 50-100 semillas aproximadamente.

Cuadro 2. Componentes de los medios de cultivo utilizados en la germinación, al 100% de la sales basales.

MS		KC	
Sales inorgánicas	mg L⁻¹	Sales inorgánicas	mg L⁻¹
Macronutrientes		Macronutrientes	
MgSO ₄	180.7	MgSO ₄ .7H ₂ O	122.125
KNO ₃	1900	MnSO ₄ .4H ₂ O	5.682
KH ₂ PO ₄	170	(NH ₄) ₂ SO ₄	500
NH ₄ NO ₃	1650	KH ₂ PO ₄	250
CaCl ₂	332.2	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	694.4
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	FeSO ₄ .7H ₂ O	25
Micronutrientes		Micronutrientes	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.331
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	H ₃ BO ₃	0.056
H ₃ BO ₃	6.2	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0624
MnSO ₄ .H ₂ O	16.9	MoO ₃	0.016
CuSO ₄ .2H ₂ O	0.025		
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25		
KI	0.83		
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.26		
Constituyentes orgánicos		Constituyentes orgánicos	
Myo-Inositol	100	Sacarosa	20000
Tiamina HCl(B1)	0.4	Agar gel	5000
Niacina	0.5		
Piridoxina(B6)	0.1		
Sacarosa	30000		
Agar gel	5000		
pH	5.7	pH	5.6

Cuadro 3. Tratamientos utilizados para la germinación de *Laelia anceps* subsp. *anceps*

Medio de cultivo	Concentración de Sales basales	
	100 %	50 %
MS	*MS 100	MS 50
KC	KC 100	KC50

*Tratamiento.

DESINFESTACIÓN DE SEMILLAS

Se eliminaron los microorganismos presentes en las semillas, por lo cual se desinfestaron entre 50 y 100 semillas aprox. dentro de un sobre elaborado con papel filtro circular (40 en total) de 4 cm de diámetro sujetado con una pinza metálica. Los sobres se sumergieron en una solución de etanol al 70% v/v durante 5 min, decantando el etanol y agregando NaOCl 0.55% por 10 min, se agitó con una varilla de vidrio en ambos casos todo el tiempo, al concluir el tiempo las semillas dentro de la solución se introdujeron a la campana de flujo laminar en funcionamiento en donde se decantó la solución y se realizaron tres enjuagues con agua destilada esterilizada, y después se llevó a cabo la siembra.

SIEMBRA *in vitro* DE SEMILLAS.

Dentro de la campana de flujo laminar y en condiciones de asepsia los sobres de papel filtro con semillas se sacaron del agua estéril con ayuda de pinzas de disección, colocándolos en una caja de Petri, en la cual se les retiró la pinza metálica; finalmente cada sobre de papel filtro con las semillas se extendió sobre el medio de cultivo contenido en cada caja de Petri. Cada 45 días se llevó a cabo la resiembra de las semillas y/o plántulas a medio de cultivo fresco.

CONDICIONES DE INCUBACIÓN.

Una vez sembradas las semillas en cada una de las cajas Petri, estas se incubaron en un cuarto de cultivo con una iluminación de 581 lux proporcionada por 4 lámparas fluorescentes de 40 W y a una distancia de 50 cm con un fotoperíodo de 16 horas luz.

EVALUACIÓN DE GERMINACIÓN

Las semillas de cada uno de los tratamientos se revisaron periódicamente, cada cuatro semanas, y se registró el número de semillas en los diferentes estadios de desarrollo. Al término de nueve meses de evaluación, tiempo en el cual se desarrollaron las plántulas con sus raíces, se seleccionó de forma azarosa una repetición de cada uno de los tratamientos para obtener el peso fresco-peso seco, determinando así el tratamiento donde se promovió la mayor velocidad de desarrollo y con mayor biomasa.

ETAPA DE DESARROLLO *in vitro* DE PLÁNTULAS

Cuando más del 50% de las plántulas obtenidas a partir de la etapa de germinación presentaron al menos dos raíces en el tratamiento MS 100, se seleccionaron aquellas de mayor talla (2-5 cm aprox.) y se transfirieron, bajo condiciones de asepsia, a medios de cultivo con fertilizantes comerciales o bien a medios con sales basales MS suplementado con sustitutos de sacarosa.

Las plántulas fueron subcultivadas cada dos meses a medio fresco.

MEDIOS DE CULTIVO

Con Fertilizantes Comerciales.

Para sustituir las sales del medio basal MS al 100% de la concentración de sus sales, el cual presentó los mejores resultados en la etapa de germinación se utilizaron tres fertilizantes foliares de uso comercial con macro y micronutrientes (Cuadro 4), Peters® (24-8-16); Floren® (10-15-5) y Folifétil® (20-30-10).

Cada uno de los tres sustitutos de las sales basales comerciales se preparó a su vez en tres diferentes concentraciones (100%, 50% y 25%), para la concentración al 100% se utilizaron 5 gr L⁻¹ de las sales de Peters y Folifétil respectivamente, y 10 mL L⁻¹ del fertilizante Floren, resultando nueve tratamientos. El medio nutritivo con sales basales MS al 100% se consideró como testigo.

El desarrollo *in vitro* de las plántulas se comparó al utilizar nueve tratamientos y el testigo (Cuadro 5), cada uno con 20 repeticiones y cada repetición de una plántula en un tubo de ensaye de 15 cm de altura con 20 mL del medio nutritivo.

Los medios de cultivo con fertilizantes se prepararon de la misma manera que el medio con sales basales comerciales MS y fueron suplementados con sacarosa, vitaminas y agargel.

Cuadro 4. Balance nutrimental de las sales utilizadas en el desarrollo *in vitro* de plántulas de *Laelia anceps* subsp. *anceps*

Sales Elemento	Fertilizantes foliares			Medio basal
	Peters 24-8-16	Floren 10-15-5	Folifértil 20-30-10	MS
	%	%	%	%
Nitrógeno Total (N)	24	8.3	20	19.9
Amoniaca	5.4	-*	10	-
Nitrato	4.8	-	-	-
Urea	14	-	10	-
Fosfato disponible(P ₂ O ₅)	8	12.45	30	0.9
Potasio soluble (K ₂ O)	16	4.15	10	18.4
Magnesio total (Mg)	0.4	0.016	-	0.9
Azufre (S)	4.7	-	0.2	1.4
Boro (B)	0.0034	0.016	0.36	0.03
Cobre (Cu)	0.02	0.009	0.069	0.0002
Manganeso quelado (Mn)	0.02	0.009	0.07	0.1
Molibdeno (Mo)	0.0009	-	0.0014	0.0023
Zinc (Zn)	0.02	0.013	0.097	0.05
Hierro (Fe)	-	0.012	0.136	0.1
Sodio (Na)	-	-	-	0.3
Yodo (I)	-	-	-	0.01
Calcio (Ca)	-	-	-	2.8
Cloro (Cl)	-	-	-	5
Otros	36.9	75	39	50

* En los espacios que no se presenta el porcentaje y se denota un guión (-), no se dispone de dicha información

Cuadro 5. Tratamientos utilizados para el desarrollo *in vitro* de plántulas de *Laelia anceps* subsp. *anceps*

Medio de cultivo/Concentración	100 %	50 %	25 %
MS	Testigo	-----	-----
Peters	*P 100	P 50	P 25
Floren	Fl 100	Fl 50	Fl 25
Folifértil	Fol 100	Fol 50	Fol 25

*Tratamiento

Con Sustitutos de sacarosa.

La determinación del efecto de sustitutos de sacarosa para el desarrollo *in vitro* de las plántulas se realizó comparando tres tratamientos y el testigo. Se utilizó el medio de cultivo con sales basales MS, el testigo se suplementó con sacarosa grado analítico (S) y para los tratamientos se sustituyó ésta con tres fuentes de carbohidratos de uso casero, azúcar refinada (AR), azúcar no refinada (ANR) y piloncillo (Pi). En todos los casos a una concentración de 30 g L^{-1} .

Los tratamientos y el testigo consistieron de 20 repeticiones y cada repetición de una planta.

EVALUACIÓN DEL DESARROLLO *in vitro* DE PLÁNTULAS

Las plántulas fueron evaluadas cada tres semanas y se registraron los siguientes parámetros: altura de la plántula, longitud de la raíz y de la hoja más larga, número de hojas, número de raíces, número, longitud y diámetro de pseudobulbos. Estas mediciones se llevaron a cabo durante 15 semanas. En la figura 8 se observa la medición de una plántula.



Fig. 8. Medición de parámetros de una plántula de *Laelia anceps* subsp. *anceps*

ACLIMATIZACIÓN DE LAS PLÁNTULAS A CONDICIONES *ex vitro*.

Las plántulas desarrolladas *in vitro* fueron aclimatizadas para su adaptación a condiciones controladas, se sacaron de los tubos de ensaye, se eliminó en su totalidad el medio de cultivo adherido a sus raíces enjuagándolas con agua destilada. Como medida preventiva, las plántulas fueron sumergidas por cinco minutos en una solución de fungicida Manzate® (1g L^{-1}).

Posteriormente se plantaron en botellas transparentes de polietilentereftalato (PET) de 600 mL, las que se cortaron transversalmente en la parte media superior, y en cajas de poliestireno expandido (unicel) de 40 por 60 cm de base y 15 cm de alto.

En ambos tipos de recipientes se colocó una mezcla de musgo *Sphagnum*-agrolita (1:1), que proveyó a las plantas de soporte, porosidad y retención de humedad. La mitad de las botellas y de las cajas contuvieron una mezcla estéril (E) del sustrato y la otra mitad una mezcla no estéril (NE).

Para el proceso de aclimatización se utilizaron plantas de *Laelia anceps* subsp. *anceps* en dos tallas diferentes, 57 plantas con una longitud de 7-11 cm y 43 con una longitud de 3.5-6 cm (Figura 9).

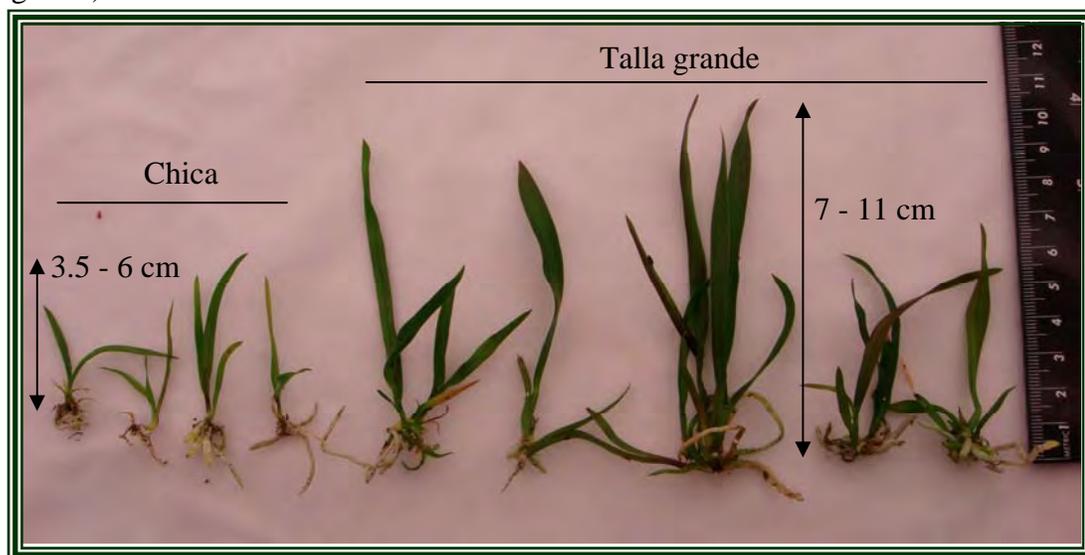


Fig. 9. Tallas de las plántulas de *Laelia anceps* subsp. *anceps* utilizadas en la aclimatización

La aclimatización de las plántulas obtenidas *in vitro* a condiciones *ex vitro* consistió de ocho tratamientos cada uno con 10-15 repeticiones. Una planta fue considerada como una repetición. Se utilizaron dos cajas de unicel, con 25 y 26 plantas respectivamente, y 25 botellas, cada una con 2 plantas, como se muestra en el cuadro 6.

Cuadro 6. Tratamientos para la aclimatización de plántulas de *Laelia anceps* subsp. *anceps* obtenidas *in vitro*.

Contenedor	Talla Plantas	Grande 7-11 cm		Chica 3.5-6 cm	
	Mezcla	E	NE	E	NE
Botellas PET		* BE	BNE	* BE	BNE
Caja de unicel		CE	CNE	CE	CNE

*Tratamiento. BE= botella PET con sustrato esterilizado; BNE= botella con sustrato no esterilizado; CE= caja de unicel con sustrato esterilizado; CNE= caja con sustrato no esterilizado

En el cultivo *in vitro* las plántulas están expuestas a una humedad atmosférica superior al 90%, por lo que la aclimatización de éstas se realizó de forma gradual para regular la evapotranspiración y la fotosíntesis; fue necesario mantener selladas las botellas con plástico autoadherible y las cajas de unicel cubiertas con papel celofán transparente, para evitar así la deshidratación de las plantas.

Se mantuvieron completamente cubiertas por una semana en el cuarto de cultivo bajo las mismas condiciones de iluminación en las que se llevó a cabo la germinación y desarrollo de las plántulas *in vitro* (Figura 10); durante las siguientes tres semanas se destaparon gradualmente las botellas y cajas, el sustrato se mantuvo ligeramente húmedo humedeciéndolo con un aspersor periódicamente, al término de estas tres semanas fueron descubiertas totalmente.

Durante el segundo mes las plantas se regaron dos veces por semana; adicionalmente, durante todo el proceso se llevó a cabo una fertilización semanal por aspersión con el fertilizante Peters 24-8-16 a una concentración de 1gr L⁻¹ de agua.



Fig. 10. Condiciones de cultivo durante la aclimatización de *Laelia anceps* subsp. *anceps*

EVALUACIÓN DE ACLIMATIZACIÓN

En todos los tratamientos se registraron los siguientes parámetros: altura de la plántula, longitud de la raíz y de la hoja más largas, número de hojas, número de raíces, peso fresco de la planta, número, longitud y diámetro de pseudobulbos (Figura 11). Estas evaluaciones se llevaron a cabo en tres ocasiones; la primera al momento de sembrar las plantas, la segunda un mes después y la última al terminar el segundo mes.



Fig. 11. Medición de una plántula de *Laelia anceps* subsp. *anceps* durante el proceso de aclimatización (izquierda). Acercamiento a las raíces (derecha).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A los datos obtenidos se les aplicó un análisis de varianza (ANDEVA) con un intervalo de confianza de 95%, utilizando el programa estadístico Statgraphics Plus 5.0, para determinar en cual de los tratamientos de la etapa de germinación, desarrollo de plántulas *in vitro* y de aclimatización se obtuvo la mayor cantidad y mejor desarrollo de plántulas de *Laelia anceps* subs. *anceps*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VIABILIDAD

Las tres cápsulas de *L. anceps* subsp. *anceps* analizadas presentaron 31, 29 y 17% de semillas viables respectivamente; este porcentaje resultó muy bajo comparado con el 98 y 88% de viabilidad reportado para dos lotes de semillas de *Laelia albida* (Santos *et al.*, 2005) y el 71.6% de viabilidad reportado también en *L. albida* por Ortiz (2001). Vujanovic y colaboradores (2000) observaron el 48% de viabilidad en semillas de la orquídea terrestre *Cypripedium reginae* al exponerlas por 24 horas a TTC.

Es probable que la testa de las semillas de la especie de estudio sea menos permeable y necesite más de 48 horas en contacto con el TTC para lograr la tinción, o bien que el bajo porcentaje de viabilidad se deba a condiciones naturales.

El método del TTC ha sido utilizado exitosamente en orquídeas epífitas tropicales (Singh, 1981), sin embargo la eficacia del TTC es limitada y ha producido resultados inconsistentes en algunas especies de orquídea, lo cual se ha atribuido a la variación en la permeabilidad de la testa de las semillas (Van Waes y Debergh, 1986).

DESARROLLO DE LA GERMINACIÓN

ESTADIOS DE DESARROLLO

Las orquídeas germinan asimbióticamente *in vitro* después de la imbibición, formando un cuerpo esférico denominado protocormo, a partir de cuya base surgen rizoides y a continuación primordios de hojas y raíces, todo lo cual permite distinguir etapas bien definidas que se usan en el cálculo de índices de crecimiento (Arditti y Ernst, 1984).

Durante el proceso de germinación de *Laelia anceps* subsp. *anceps* se lograron registrar y distinguir, desde los 7 hasta los 260 días de cultivo, seis estadios de desarrollo:

1)  Protocormo: debido a la imbibición el embrión rompió la testa de la semilla y adquirió una forma esférica-oval, con una pequeña protuberancia apical. Los protocormos se observaron de color verde (Pcf= protocormos clorofílicos) o bien carentes de clorofila (ct= cloróticos).

2)  Protocormo con un primordio de hoja (Ph): en la región apical del protocormo se distinguió el desarrollo inicial de la primer hoja.

3)  Brotación múltiple (Brm): algunos protocormos desarrollaron dos o más ápices al mismo tiempo y de estos se diferenciaron plántulas unidas por la base.

4)  Plántula con una hoja (h): el primordio de hoja se diferenció en una hoja, en este momento se consideró como plántula con una hoja.

5)  Plántula con dos hojas (2h): en la plántula se desarrolló la segunda hoja.

6)  Plántula con dos hojas y raíces (2hcr): de la base de la plántula emergió la primera raíz, para fines prácticos se consideró dentro de este estadio a las plántulas con una, dos o más raíces.

La secuencia de los estadios de desarrollo durante el proceso, desde los 7 hasta los 260 días de cultivo, dependiendo de los tratamientos utilizados fue la siguiente:

A los 7 días posteriores a la siembra se observó el hinchamiento de las semillas; en el tratamiento MS 100 las semillas presentaron una coloración pardusca a simple vista.

A los 14 días se observó el desarrollo de protocormos en los cuatro tratamientos. En el tratamiento MS 100 presentaron una coloración verde brillante; en el tratamiento MS 50 se observaron con coloración verde pálido, mientras que en los tratamientos KC 50 y KC 100 una minoría mantuvieron el color amarillo verdoso y el resto amarillos.

Estas observaciones coinciden con las reportadas por Stenberg y Kane (1998) para *Encyclia boothiana*, quienes registraron la imbibición o hinchamiento de las semillas durante la primer semana, así como la ruptura de la testa y germinación comenzando la segunda. Buyun y colaboradores (2004) observaron la germinación de varias especies de *Cattleya*, que desarrollaron protocormos de color blanco-lechoso durante las 2 ó 3 semanas posteriores a la siembra y tiempo después adquirieron un color verde brillante.

Los resultados coinciden parcialmente con el desarrollo de *Laelia autumnalis*, que presentó el 10% de las semillas en estadio de protocormo a los 21 días de cultivo (Sierra, 2006); sin embargo difieren en la velocidad de germinación con semillas de *Laelia speciosa*, las cuales germinaron a las 5 semanas posteriores a la siembra en el medio MS suplementado con 500 mg/L de carbón activado, 500 mg/L de extracto de plátano, 1 g/L de peptona, 2 mg/L de BAP y 1 mg/L de ANA (Barrera *et al.*, 2005); en semillas de *Laelia albida* cultivadas en KC suplementado con sacarosa, o con sacarosa y extracto de papa, se presentó el hinchamiento de las semillas durante los primeros 15 días, la germinación 24 días después y la presencia de protocormos bien diferenciados hasta los 46 días; es importante señalar que a partir del día 45 de cultivo registraron una elevada mortalidad de las plantas (90 %) en el medio suplementado con sacarosa únicamente (Santos *et al.*, 2005).

A los 74 días después de la siembra las semillas en cada uno de los tratamientos desarrollaron diferentes estadios con las siguientes características:

MS 100. Todos los protocormos desarrollados en este tratamiento presentaron color verde brillante. Aproximadamente el 75 % de estos protocormos adquirió un aspecto anormal con apariencia de tejido calloso, además de presentar el doble o triple del tamaño del resto de los protocormos desarrollados en este medio.

MS 50. La coloración de los protocormos desarrollados fue igual a los del tratamiento MS 100 y aproximadamente el 30 % se diferenciaron en plántulas con una o dos hojas.

KC 50. Los protocormos que se desarrollaron exhibieron color verde amarillento y muy pocos se diferenciaron en plántulas con una hoja. La mayoría adquirió un aspecto anormal o deforme similar a los del tratamiento MS 100; además se observaron algunos protocormos carentes de clorofila (cloróticos).

KC 100. La coloración de la mayoría de los protocormos desarrollados fue igual a los del tratamiento MS 50 y algunos cloróticos, otros se diferenciaron en protocormos con un primordio de hoja, con una hoja o con dos.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Ichihashi (1979) para *L. anceps* ya que a los 63 días de cultivo, en el medio KC las semillas alcanzaron el estadio de protocormo y muchos de estos presentaban la apariencia de tejido calloso o tejido no organizado.

Se presentaron diferencias con lo observado por Stenberg y Kane (1998) en *Encyclia boothiana*, en la cual reportaron a los 80 días de cultivo (semana 12) en los medios MS y KC al 100% la presencia de protocormos verde brillante y plántulas con una o dos hojas en ambos medios, y la primer plántula con raíz en el medio MS. También existieron diferencias con el desarrollo de plántulas de *Cattleya* cultivadas en KC 100%, que mostraron una respuesta totalmente diferente, puesto que murieron o fueron cloróticas (Knudson, 1951).

Laelia albida cultivada en KC 100% suplementado con sacarosa y extracto de papa presentó un grado de desarrollo similar al de *L. anceps* subsp. *anceps* debido a que presentó protocormos y las primeras plántulas con una sola hoja a los 74 días de cultivo (Santos *et al.*, 2005).

Es probable que la mayor vigorosidad de los protocormos y plántulas de *Laelia anceps* subsp. *anceps* en el medio MS se deba a que este contiene una mayor cantidad de nitrógeno suplementado en forma de amonio. Smith (1932) encontró que al duplicar y triplicar la cantidad de amonio en el medio Knudson B (Knudson, 1922, 7.56 mM) incrementó el vigor y color verde en plántulas de un híbrido del género *Cattleya*; mientras La Garde (1929), reportó que al duplicar la cantidad de amonio del medio de cultivo KC, la germinación y el desarrollo de las plántulas de *Cattleya* y *Laeliocattleya* mejoró. Estudios comparativos han demostrado que en algunas especies de orquídeas la mayoría de los embriones germinan en medios que contienen amonio en lugar de nitrato como fuente de nitrógeno (Curtis y Sporel, 1948; Raghavan y Torrey, 1964).

En plántulas de *Cattleya* la actividad de la enzima nitrato reductasa se observa hasta los 60 días después de la germinación, de manera que el nitrato no está disponible para el crecimiento (Hew y Yong, 2004; Raghavan y Torrey, 1964). El N es un constituyente de muchos compuestos esenciales como el adenosín trifosfato (ATP), enzimas, proteínas estructurales y ácidos nucleicos; y en un medio con baja concentración de amonio se provoca la disminución en la asimilación de N, lo cual se traduce en una germinación y desarrollo pobres (Stenberg y Kane, 1998).

Adicionalmente, la cantidad de N en forma de amonio es 40 veces mayor a la de nitrato en los flujos de nutrimentos sobre los troncos en la naturaleza (Hew y Yong, 2004), así que la asimilación de este elemento principalmente en forma de amonio, responde a condiciones naturales.

A los 97 días se presentaron las primeras plántulas con raíz de *Laelia anceps* subsp. *anceps* en los tratamientos MS 50, MS 100 y KC 100, sin embargo el mayor porcentaje de plántulas con hojas (Figura 12) se obtuvo en el tratamiento MS 50 con un 30 %. Sierra (2006) reportó para *Laelia autumnalis* a los 90 días de cultivo, en el medio MS, que 50% de las semillas se diferenciaron en plántulas con dos hojas, y también observó las primeras plántulas con raíz.

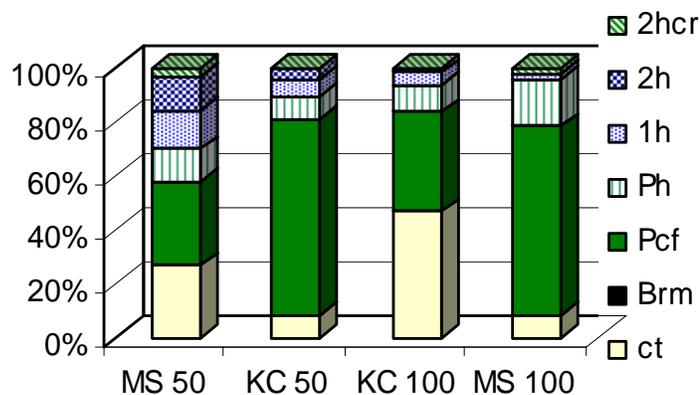


Fig. 12. Efecto de los tratamientos durante la germinación *in vitro* de *Laelia anceps* subsp. *anceps* a los 97 días de cultivo. 2hcr= 2 hojas con raíces; 2h= 2 hojas; 1h= 1 hoja; Ph= Primordio de hoja; Pcf= Protocormo clorofílico; Brm= Brotación múltiple; ct= P. clorótico

A los 110 días se observaron aproximadamente 50% de las semillas germinadas en el tratamiento MS 100, 70% en el MS 50, 60% en KC 100 y 50% en el tratamiento KC 50. De forma similar, Ichihashi (1979) observó un mayor porcentaje de germinación para las semillas de *Bletilla striata* cultivadas en un medio con baja concentración iónica que en los de mayor concentración.

El tratamiento MS 50 favoreció el desarrollo de una mayor cantidad de plántulas con raíz (14%) de *Laelia anceps* subsp. *anceps*, el resto de los tratamientos fueron iguales estadísticamente para favorecer el desarrollo de plántulas con raíces (Fig. 13). La mayor cantidad (20%) de plántulas con 1 o 2 hojas se presentó en los tratamientos MS 50 y KC 50, resultando ser estadísticamente diferentes a los tratamientos restantes. El porcentaje de protocormos clorofílicos presentes en los cuatro tratamientos resultó igual estadísticamente. La mayor cantidad de protocormos cloróticos (47%) se desarrollo en KC 100.

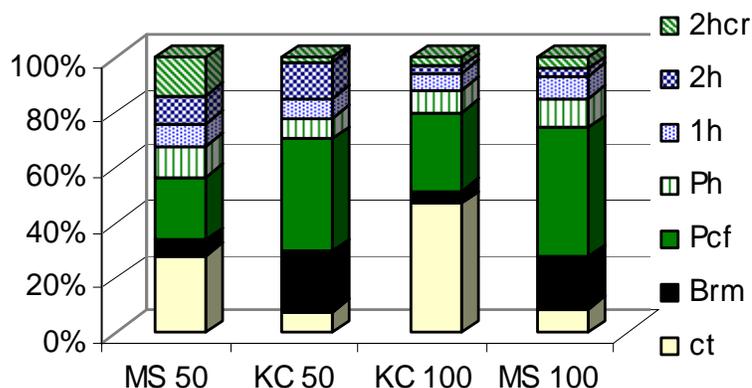


Fig. 13. Efecto de los tratamientos durante la germinación *in vitro* de *Laelia anceps* subsp. *anceps* a los 110 días de cultivo. 2hcr= 2 hojas con raíces; 2h= 2 hojas; 1h= 1 hoja; Ph= Primordio de hoja; Pcf= Protocormo clorofílico; Brm= Brotación múltiple; ct= P. clorótico

Los resultados obtenidos con *Laelia anceps* subsp. *anceps* difieren de los reportados por Santos y colaboradores (2005) quienes encontraron a los 106 días de cultivo en KC 100, suplementado con sacarosa y extracto de papa, que el 40% de las plántulas germinadas de *Laelia albida* estaba en estadio de protocormo y el 60% restante fueron plántulas con una hoja. También difieren con Stenberg y Kane (1998), quienes reportan plántulas de *Encyclia boothiana* con 2 o 3 hojas en MS y KC 100%, aunque las plántulas con 3 hojas y las que presentaron raíces fueron más comunes en KC.

Después de 148 días de cultivo el mayor porcentaje de plántulas con raíz se obtuvo en los tratamientos MS 50 con 41.5 % y en MS 100 con 31.4 %, estos tratamientos resultaron diferentes estadísticamente a los restantes; ya que en KC 50 se obtuvieron el 10.3 % de plántulas con raíz y en KC 100 el 4.5 % (Fig. 14). Los estadios pueden observarse en la figura 15.

Estos resultados son opuestos a lo reportado para *Encyclia boothiana* (Stenberg y Kane, 1998) donde el mayor porcentaje (37.9 %) de plántulas con raíz fue registrado en el medio KC 100, mientras que en el MS 100 fue de 11.4 %. Sin embargo coinciden con los obtenidos por Sierra (2006), quien encontró 40 % de plántulas de *Laelia autumnalis* con dos hojas y 40% con raíces a los 130 días de cultivo en MS.

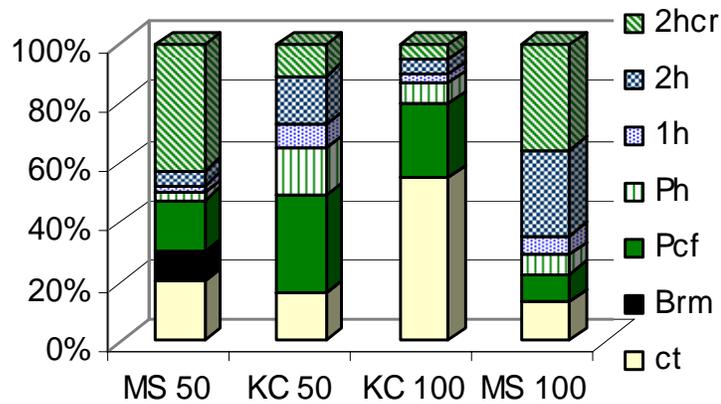


Fig. 14. Efecto de los tratamientos durante la germinación *in vitro* de *Laelia anceps* subsp. *anceps* a los 148 días de cultivo. 2hcr= 2 hojas con raíces; 2h= 2 hojas; Ph= Primordio de hoja; Pcf= Protocormo clorofílico; ct= P. clorótico; Brm= Brotación múltiple



Fig. 15. Estadios de desarrollo observados a los 148 días de cultivo durante la germinación *in vitro* de *Laelia anceps* subsp. *anceps*

En *Encyclia boothiana* Stenberg y Kane (1998) reportaron a los 150 días de cultivo 37.9% de plantas con raíz en KC 100 y 11.4 % en MS 100, indicando que los cultivos se desarrollaron más en KC que en MS a los 150 días; estos resultados son opuestos a los obtenidos en el presente estudio lo que probablemente indica que *Laelia anceps* subsp *anceps* es una especie que requiere una mayor concentración de nutrientes en el medio; ya que la

mayoría de los iones suplementados en MS tienen niveles iguales o mayores a los suplementados en KC. El medio con mayor concentración de sales, de 37 evaluados por Arditti y Ernst, es el medio MS. Este es 136 veces más concentrado que la cantidad de nutrimentos disponibles sobre los troncos para el desarrollo de los protocormos en la naturaleza (Arditti y Ernst, 1984).

Aparentemente la necesidad elevada de nutrimentos en el cultivo *in vitro* responde al hecho de que la plántula no es capaz de asimilar eficientemente los nutrimentos disponibles en el medio de cultivo.

Las orquídeas se desarrollan generalmente en condiciones de nutrimentos muy escasos y su supervivencia solo puede ocurrir gracias a la asociación con un hongo micorrízico. La estimulación del desarrollo durante la germinación seguido a la infección es asociada a la provisión por parte del hongo de nutrimentos específicos y generales, particularmente compuestos de carbón, hasta que la etapa heterotrófica de la plántula concluye (Hadley y Pegg, 1989). Hay evidencias que indican que en condiciones de estrés, la micorriza favorece la asimilación de compuestos de nitrógeno y fosfatos, y un desarrollo más acelerado de las plantas en relación a plantas cultivadas sin el simbiote (Alexander *et al.*, 1984; Alexander y Hadley, 1984; Hadley y Pegg, 1989).

Luego de 200 días de cultivo, las semillas de *Laelia anceps* subsp. *anceps* en los tratamientos MS al 100 y 50 generaron la mayor cantidad de plántulas con raíces (aproximadamente 60%) siendo iguales estadísticamente. En ambos tratamientos se generó un menor porcentaje de protocormos cloróticos (7 y 18%), mientras que en los tratamientos KC 100 y 50 fue de 59 y 36% respectivamente y solamente del 10% al 15% de plántulas con raíz en cada uno (Figura 16). Estos resultados se obtuvieron aún cuando el medio KC fue el primer medio de cultivo formulado especialmente para la germinación de semillas de orquídeas, sin embargo, presenta un desequilibrio en el balance entre los iones de los componentes nutricionales (Ichihashi, 1979). La cantidad y concentración de sales basales presentes entre los medios de cultivo MS y KC es muy diferente; el MS es un medio muy rico en sales, además de contener vitaminas, lo cual favoreció una germinación y desarrollo más vigoroso de la especie en estudio.

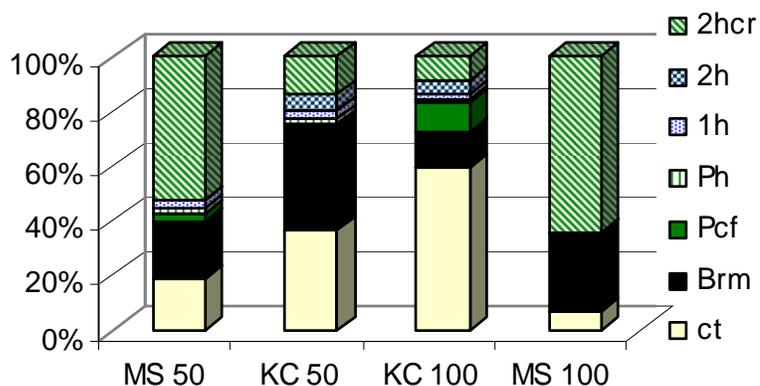


Fig. 16. Efecto de los tratamientos durante la germinación *in vitro* de *Laelia anceps* subsp. *anceps* a los 200 días de cultivo. 2hcr= 2 hojas con raíces; 2h= 2 hojas; Ph= Primordio de hoja; Pcf= Protocormo clorofílico; ct= P. clorótico; Brm= Brotación múltiple

Esta tendencia de protocormos cloróticos en los tratamientos con KC y de plántulas con raíz en los tratamientos con MS se mantuvo a los 260 días, y se registró un total de 63 individuos en el tratamiento MS50, de los cuales el 60.3% eran plántulas con raíces y el 14.3% protocormos cloróticos; en el MS 100 hubo 98 individuos, de los cuales el 35.7% eran plántulas con raíz, el 23.5% plántulas con 1 o 2 hojas y el 13.3 % protocormos cloróticos; 84 individuos se registraron en el KC 50 de las cuales el 7.1% eran plántulas con raíz, 3.6% plántulas con 1 o 2 hojas y 63.1% eran protocormos cloróticos; finalmente 72 individuos en el KC 100, se observaron 11.1% plántulas con raíz y 59.7% protocormos cloróticos (Figura 17).

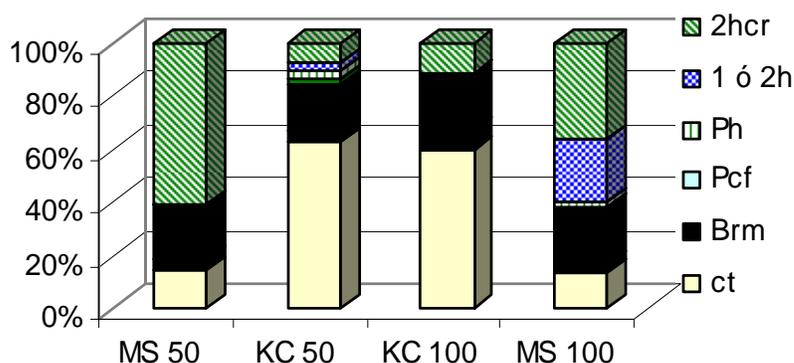


Fig. 17. Efecto de los tratamientos durante la germinación *in vitro* de *Laelia anceps* subsp. *anceps* a los 260 días de cultivo. 2hcr= 2 hojas con raíces; 1 ó 2h= plántulas con 1 o 2 hojas; Ph= Primordio de hoja; Brm= Brotación múltiple; Pcf= Protocormo clorofílico; ct= P. clorótico

VELOCIDAD DEL DESARROLLO Y BIOMASA DE PLANTULAS

A los 260 días de cultivo, el mayor número de hojas y brotes promedio por plántula de *Laelia anceps* subsp. *anceps* y estadísticamente diferente se registró en aquellas cultivadas sobre el medio KC 50 (Fig. 18). Estos resultados difieren con los obtenidos en *Encyclia boothiana* (Stenberg y Kane, 1998) ya que en ambos medios, MS y KC, se obtuvieron resultados similares respecto al número de hojas.

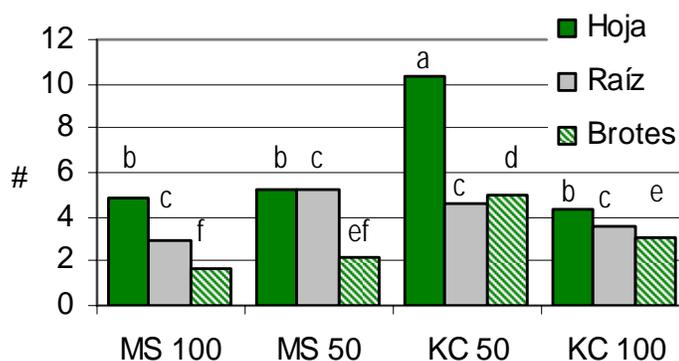


Fig. 18. Desarrollo de estructuras por plántula a los 260 días de cultivo. Las letras sobre las barras indican las similitudes estadísticas entre los tratamientos, las barras con la misma letra, son iguales estadísticamente.

Las plántulas que presentaron una mayor altura (2.6 cm) se obtuvieron en el tratamiento MS 100, seguido del MS 50 con 1.7 cm, ambos resultaron ser estadísticamente diferentes al resto de los tratamientos. Las plántulas con raíces más largas (2.7 cm), se generaron en el tratamiento MS 50 y los otros 3 tratamientos fueron iguales estadísticamente y presentaron raíces de 1.6 cm aproximadamente (Fig. 19). En la figura 20 se observa el mayor crecimiento de las plántulas en el tratamiento MS 100.

En *Encyclia boothiana*, Stenberg y Kane (1998) a los 252 días de cultivo (36 semanas) observaron plántulas con un promedio de 4.8 raíces y longitud de hoja de 0.9cm y de raíz de 0.6cm en el medio MS 100, mientras que en el KC 100 se presentó un menor número promedio de raíces (3.9), pero de mayor longitud (1cm), y una menor longitud de hojas (0.6cm).

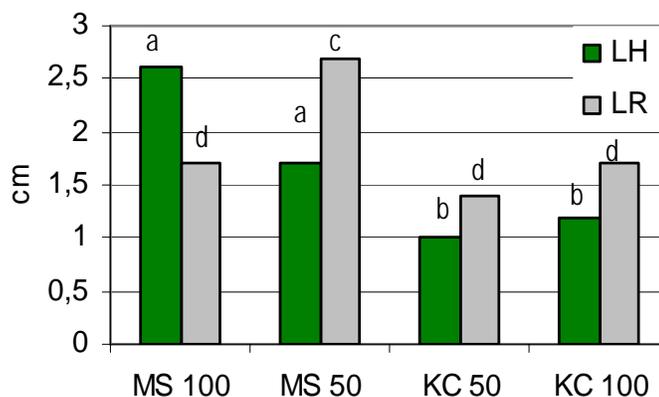


Fig. 19. Crecimiento de las plántulas de *Laelia anceps* subsp. *anceps*. a los 260 días de cultivo. L= longitud; H= hoja; R= raíz. Las letras sobre las barras indican las similitudes estadísticas entre los tratamientos, las barras con la misma letra, son iguales estadísticamente.

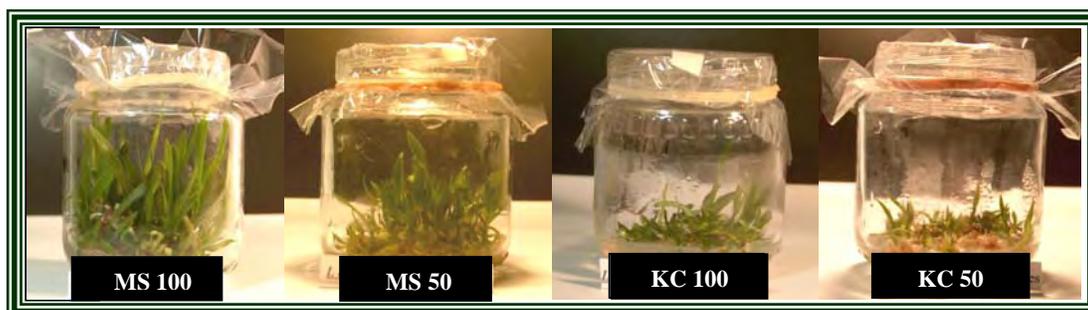


Fig. 20. Plántulas de *Laelia anceps* subsp. *anceps* desarrolladas a los 260 días de cultivo en cada tratamiento durante la etapa de germinación.

Por su parte Adelberg y colaboradores (1997) plantaron híbridos de *Sophrolaeliocattleya* Jewel Box “Scheherezade” y *Brassolaeliocattleya* Rugley’s Mill “Mendenhall”, de aproximadamente 0.04 g/planta, para su desarrollo en un sistema de cultivo de membrana con medio líquido, utilizaron los medios especializados para orquídeas KC, VW y Lindemann; el medio de cultivo MS al 100, 50 y 25 % de la concentración de sus sales y la solución Hoagland utilizada en cultivo hidropónico. Luego de seis meses de cultivo determinaron que los pesos frescos más elevados se encontraron en el medio MS 100 (3-6 g/planta), MS 50 (2-6 g), MS 25 y la solución de Hoagland (ambos con 2-4 g), por su parte KC presentó un peso fresco de 1-3 g/planta. MS 100 fue el único medio que produjo plántulas con más retoños que raíces, los demás produjeron más raíces que retoños, y un elevado desarrollo radical se dio en MS 50%, MS 25% y en Hoagland.

El peso fresco total de las plántulas de *Laelia anceps* fue mayor en el medio MS 100 con 8g (Figura 21), distribuidos 4.8 g en hojas y 3.3 g en raíces; mientras que en el MS 50% se obtuvieron 4g (1.4 g de hojas y 2.6 g de raíces). De esta manera se determinó que a pesar de que las dos concentraciones del medio MS presentaron el mismo estadio de desarrollo, en el MS 100 se generó un mayor incremento en la biomasa, reflejado en plántulas más vigorosas, por lo cual resulta recomendable utilizar este medio para el mejor desarrollo de las plántulas *in vitro* durante los primeros meses de germinación de las semillas. Mientras que el MS 50 generó mayor biomasa en las raíces en relación a las hojas, así que sería recomendable subcultivar en este medio las plántulas obtenidas en MS 100 durante un mes antes de la aclimatación *ex vitro* con el fin de generar un mejor sistema radical.

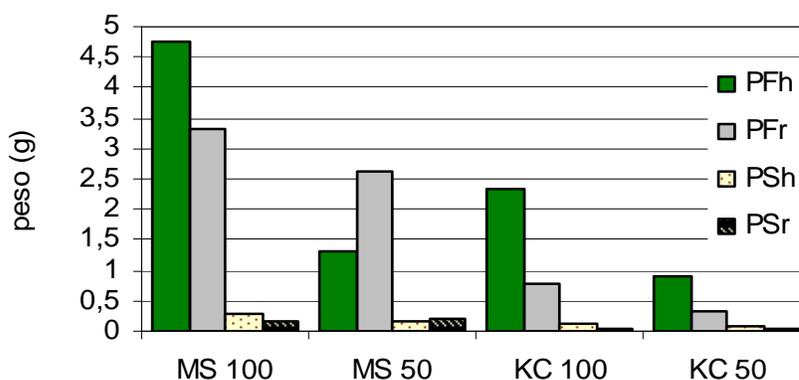


Fig. 21. Biomasa de las plántulas. PF= peso fresco; PS= peso seco; h=hojas; r= raíces.

Es probable que el elevado desarrollo radicular de *Laelia anceps* subsp. *anceps* tanto en longitud como en peso fresco de raíces presente en MS 50 se origine en respuesta a las bajas concentraciones de nutrimentos, amonio especialmente, por lo cual las plantas desarrollan una mayor superficie radical para aumentar su asimilación. Se ha observado que bajos niveles de amonio promovieron el crecimiento de raíces durante la micropropagación de *Philodendron* (Sriskandarjhi y Skirvin, 1991) y de *Bletilla striata* (Ichihashi, 1979). En estos términos se esperaría un desarrollo radical similar para KC 100 y KC 50. A pesar de que se aprecia un mayor número promedio de raíces por plántula (5.2) en MS 50 resultó igual estadísticamente al obtenido en el KC 50 con 4.5 y en el KC 100 con 3.6. Sin embargo estos dos tratamientos tienen menor concentración de nutrimentos que el MS 50 y a pesar de que las plántulas tenían un número elevado de raíces, carecían de la cantidad y concentración mínima de sales necesarias para desarrollarse vigorosamente, por lo cual presentaron raíces mucho más cortas.

ETAPA DE DESARROLLO FERTILIZANTES

Las semillas de orquídea inducidas a germinar simbiótica o asimbióticamente dependen de una fuente externa de nutrimentos simples para su desarrollo posterior (Manning y Van Staden, 1987).

En este estudio, las plántulas se desarrollaron adecuadamente en los medios sustituidos con fertilizantes y no se observó sintomatología de deficiencias nutrimentales, a pesar de que estos fertilizantes no reportan el contenido de algunos elementos esenciales (véase cuadro 7) para el desarrollo de las plántulas, como es el caso de los macro elementos S, Mg y los micro elementos Mo y Fe; es probable que estos elementos se encuentren en cantidades traza dentro del fertilizante, o bien que las plántulas (en el caso de los tres primeros) los hayan asimilado en la etapa de germinación y los trasladaron a los nuevos brotes.

Las orquídeas son similares a otras plantas en sus requerimientos, con la excepción de que puede pasar mucho tiempo (incluso más de tres meses) para evidenciar una deficiencia mineral, por ejemplo, plántulas de *Cattleya* cultivadas sin Fe sobre cuarzo purificado no evidenciaron síntomas de deficiencia durante siete meses de cultivo (Hew y Yong, 2004). Las deficiencias pueden afectar a toda la planta, si son capaces de redistribuir los elementos insuficientes, o bien, pueden afectar solo al nuevo crecimiento (Hew y Yong, 2004).

Stancato y Faria (1996) demostraron en un estudio sobre los efectos de macro y micronutrimentos en el crecimiento *in vitro* de *Laelia cinnabarina*, que no suplementar los elementos esenciales al medio de cultivo *in vitro* afecta el desarrollo de las plántulas, especialmente en el caso del nitrógeno, fósforo, calcio y azufre, que al no estar presentes se reduce drásticamente el crecimiento y la generación de biomasa en las plántulas.

Dendrobium nobile y *Cymbidium pumilum* mostraron poco crecimiento en medios sin micronutrimentos, excepto Fe, de manera que la adición de micro elementos parece tener efectos estimulantes en el crecimiento de las plantas (Ichihashi, 1979).

Cuadro 7. Balance nutrimental de los medios de cultivo al 100% de la concentración de sus sales

Sales	Peters	Floren	Folifétil	MS
Elemento	24-8-16	10-15-5	20-30-10	
mg/L de medio				
Nitrogeno Total (N)	1200.0	830.0	1000.0	840.65
Amoniacal	270.0	-	500.0	288.8
Nitrato	240.0	-	0.0	551.8
Urea	700.0	-	500.0	0.0
Fosfato disponible (P ₂ O ₅)	400.0	1245.0	1500.0	39.13
Potasio soluble (K ₂ O)	800.0	415.0	500.0	791.63
Magnesio total (Mg)	20.0	1.6	-	3.7
Azufre (S)	235.0	-	10.0	58.3
Boro (B)	0.17	1.6	17.9	1.1
Cobre (Cu)	1.0	0.09	3.46	0.0064
Manganeso quelado (Mn)	1.0	0.09	3.48	5.5
Molibdeno (Mo)	0.045	-	0.07	0.1
Zinc (Zn)	10	1.3	4.86	2.0
Hierro (Fe)	-	1.2	6.82	5.6
Sodio (Na)	-	-	-	12.2
Yodo (I)	-	-	-	0.64
Calcio (Ca)	-	-	-	121.1
Cloro (Cl)	-	-	-	214.2

* En los espacios que no se presenta el porcentaje y se denota un guión (-), no se dispone de dicha información

Después de 100 días de cultivo los tratamientos con fertilizantes que favorecieron una mayor altura promedio de las plántulas de *Laelia anceps* subsp *anceps* fueron Floren y Peters al 25%, con 7.5 cm y 7.1 cm respectivamente (Figura 22), sin presentar diferencias significativas entre ellos. Las plántulas de menor longitud (4, 3.3 y 4.8 cm) se presentaron en P, Fl y Fol al 100%. En la figura 23 se observan plántulas de cada tratamiento.

Estos resultados son opuestos a los obtenidos por Do Valle y Tadeu (2005), quienes encontraron una mejor respuesta de *Catasetum fimbriatum* en el medio MS que en los medios que contenían fertilizantes. Después de 6 meses de cultivo se desarrollaron plántulas de mayor longitud (6 cm) en MS 100 y MS al 50%; las de menor tamaño (1.8 cm) se desarrollaron en el medio con fertilizante 10-5-5. En *Cyrtopodium paranaensis* observaron las plantas de mayor longitud (8.7 cm) en MS 50 y las menores (1.91 cm) en el medio con fertilizante 10-5-5 (Do Valle y Tadeu, 2005).

La mayor cantidad promedio de hojas por planta (10.7) en *Laelia anceps* subsp. *anceps* se obtuvo en P al 100%, sin embargo no hay diferencias significativas con el resto de los tratamientos, a pesar de que el número más bajo fue de 4 hojas por planta; en el testigo MS se obtuvo un promedio de 7 hojas por planta (Figura 24).

El balance N-K es importante, altas concentraciones de N y bajas de K favorece el crecimiento vegetativo (Baker y Baker, 1998). En estudios de fertilización realizados con *Cymbidium hybridum*, el nitrógeno fue el factor más importante en el crecimiento de las hojas y el fósforo en la floración (JiuZhou, 2005).

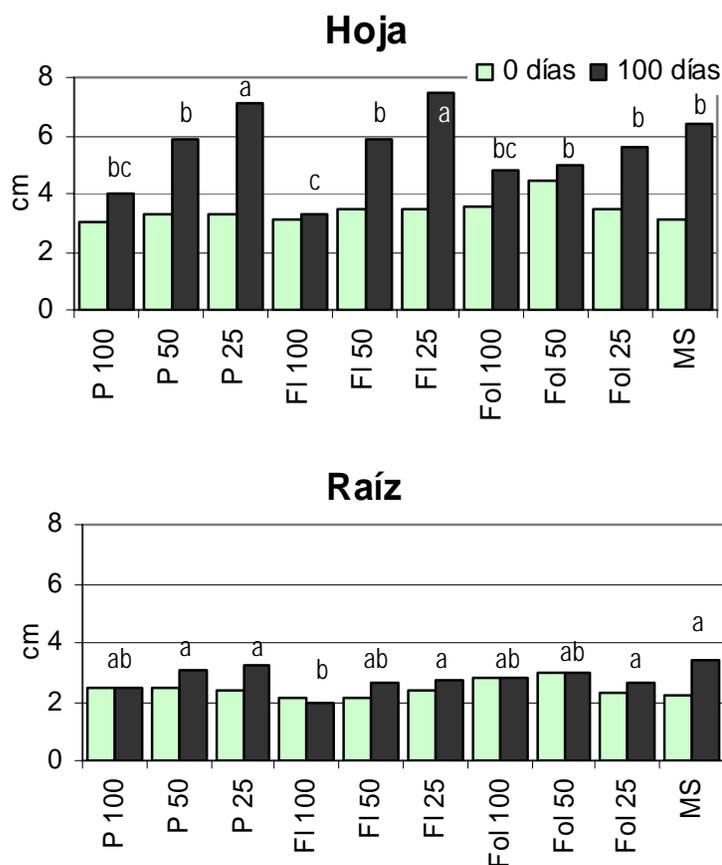


Fig. 22. Crecimiento *in vitro* de plantulas de *Laelia anceps* subsp. *anceps* en los tratamientos con fertilizantes y en MS. P= Peters; FI= Floren; Fol= Folifértil; MS= Testigo. Las letras sobre las barras indican las similitudes estadísticas entre los tratamientos, las barras con la misma letra, son iguales estadísticamente.

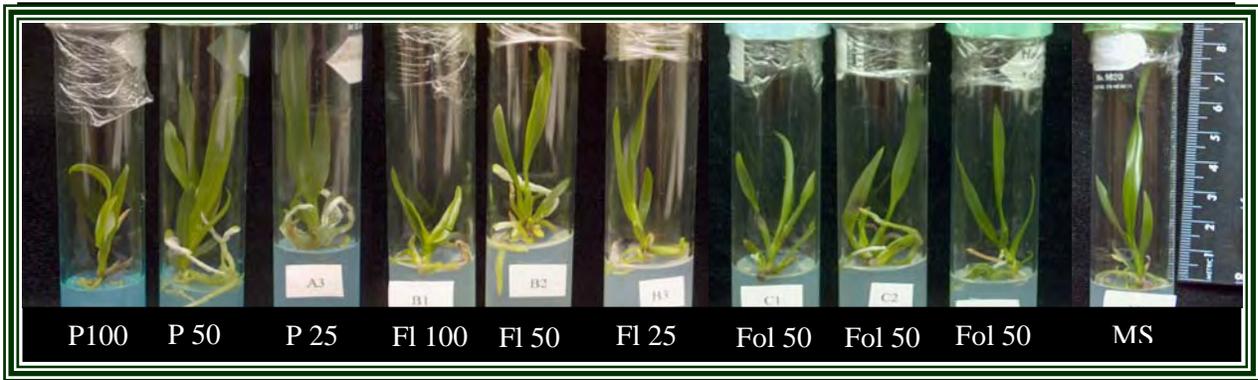


Fig. 23. Plántulas de *Laelia anceps* subsp. *anceps* desarrolladas después de 100 días de cultivo en los tratamientos con fertilizantes y en MS

El mayor número de raíces (10.6) por planta se obtuvo en el tratamiento Fl 25, 8.7 raíces por planta en Fl 50 y 8.6 en P 25 (Figura 24); el menor número se obtuvo en la concentración al 100% de P, Fl y Fol con 5, 4.9 y 5.3 raíces por planta; los valores de longitud de raíces resultaron muy similares estadísticamente, y alcanzaron un promedio de 2 a 3.4 cm (Fig. 22).

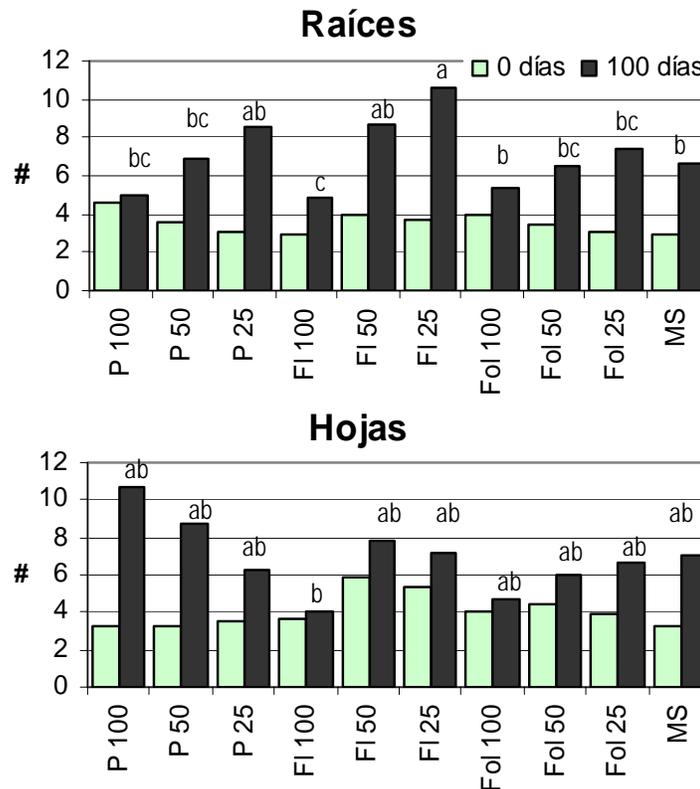


Fig. 24. Número promedio de hojas y raíces por planta en los medios de cultivo con fertilizantes. P= Peters; Fl= Floren; Fol= Folifértil; MS= Testigo. Las letras sobre las barras indican las similitudes estadísticas entre los tratamientos, las barras con la misma letra, son iguales estadísticamente.

Estos resultados concuerdan y se confirman con los resultados obtenidos en la etapa final de la germinación (260 días) de *Laelia anceps* subsp *anceps*, ya que coincide en que se desarrolla una mayor cantidad de raíces en medios con concentraciones más bajas de nutrimentos.

Por otro lado, Poole y Seeley (1978) mencionan que al incrementar gradualmente la concentración de N llega a un punto en el que las concentraciones elevadas disminuyen en mayor grado el crecimiento de las raíces de las plantas de *Cattleya* que el de las hojas o pseudobulbos.

Do Valle y Tadeu (2005) observaron que para *Catasetum fimbriatum* el mayor número de raíces por planta (3.5 y 3.2) en el medio MS al 50% y en el fertilizante 10-30-20. El menor número (1.6) se dio en el medio Vacin & Went (VW) y en el fertilizante 10-5-5. Las raíces más largas en el fertilizante 10-5-5 con 8.04 cm y las menores en VW con 1.52 cm. En *Cyrtopodium paranaensis* reportan el mayor número de raíces por planta (4.76) en MS al 25% y el menor (1.92) en VW. Las de raíces más largas (4.3 cm) en el fertilizante 10-5-5 y las mas cortas (1 cm) en VW.

El medio P en las concentraciones 100% y 25% presentó el mayor porcentaje de plantas con pseudobulbos (67 y 70%) en *L. anceps*, seguido de Folifértil en las concentraciones 100 y 50% con 67 y 60% respectivamente, y finalmente en el medio Floren al 25% se obtuvieron el 50% de las plantas con pseudobulbos (Figura 25). El medio testigo MS presentó la menor cantidad con solo 8%.

YunZhai y SiQing (2005) encontraron que el potasio es un factor que determina la brotación de hojas y número de brotes florales de *Cymbidium hybridum*, mientras que el efecto del nitrógeno fue significativo en el desarrollo de pseudobulbos, calidad floral y número de flores por inflorescencia.

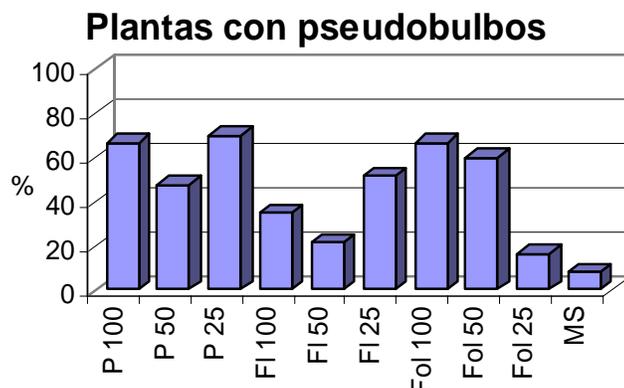


Fig. 25. Desarrollo de plantas con pseudobulbos a los 100 días de cultivo en los tratamientos con fertilizantes y en MS. P= Peters; FI= Floren; Fol= Folifértil; MS= Testigo.

Ya que una mayor concentración de nutrimentos se asocia con un mejor desarrollo de las plantas, se esperaría que los medios de cultivo con el 100% de las sales presentaran las plantas de mayor altura, número de hojas, longitud y número de raíces, sin embargo, de manera general el comportamiento de las plantas no se ajusta a este patrón, al parecer esta concentración de sales resulta excesiva para las orquídeas, aunque no se presentan síntomas de intoxicación.

Un excesivo contenido de nitrógeno en la planta puede reducir la acumulación de hidratos de carbono en la célula con lo que la pared celular puede verse afectada y en consecuencia obtener plantas más débiles; estos efectos desfavorables pueden ser contrarrestados por el potasio, por su acción estimuladora sobre los azúcares (Domínguez, 1989).

Poole y Seeley (1978) compararon la asimilación de N, K y Mg en el cultivo en invernadero de los géneros *Cattleya*, *Cymbidium* y *Phalaenopsis*, y encontraron que el N fue el factor más importante en el crecimiento de los tres géneros. En el caso de *Cattleya* la adición de niveles cada vez más elevados de N generó un incremento del crecimiento hasta llegar al punto en el que la concentración de N llega a ser tóxico o limita otros factores necesarios para el crecimiento adecuado de la planta.

CARBOHIDRATOS SUSTITUTOS

El tratamiento donde las plántulas tuvieron menor talla y longitud de raíces (Figura 26) fue con Piloncillo (Pi) y resultó el único tratamiento diferente estadísticamente. La mayor longitud de las raíces se presentó en el tratamiento S aún cuando resultó estadísticamente igual a los tratamientos AR y ANR.

En el número de raíces generadas por plántula (Figura 26) no existieron diferencias significativas, aunque la menor cantidad de raíces se generaron en el tratamiento Pi. La mayor cantidad de hojas fue generada en el tratamiento con azúcar refinada (AR), sin embargo no existieron diferencias significativas con ninguno de los otros tratamientos (Figura 26).

El desarrollo de pseudobulbos en estos cuatro tratamientos, fue poco representativo, ya que solo se registraron en dos plántulas de una muestra de 25 en el tratamiento S. En la figura 27 se aprecia el menor crecimiento en el tratamiento Pi.

Probablemente el menor desarrollo de las plántulas cultivadas en el tratamiento con piloncillo (Pi) fue provocado por la gran cantidad de impurezas que contiene. Ya que el piloncillo está formado de azúcares sólidos de caña no refinados obtenidos de la evaporación de los jugos de la caña cocidos a altas temperaturas, contiene además de sacarosa, contenidos significativos de glucosa, fructosa, grasas, proteínas, minerales y vitaminas como el ácido ascórbico. Entre los principales minerales figuran: el calcio (Ca), potasio (K), magnesio (Mg), cobre (Cu), Hierro (Fe) y fósforo (P), como también trazas de flúor (F) y selenio (Se) (Castedo, 2007).

En contraparte, los resultados en el desarrollo de las plántulas en los tratamientos con S, AR, y ANR no presentaron diferencias significativas, por lo cual resulta viable la sustitución de la sacarosa grado analítico, en el medio de cultivo, por azúcar refinada o no refinada.

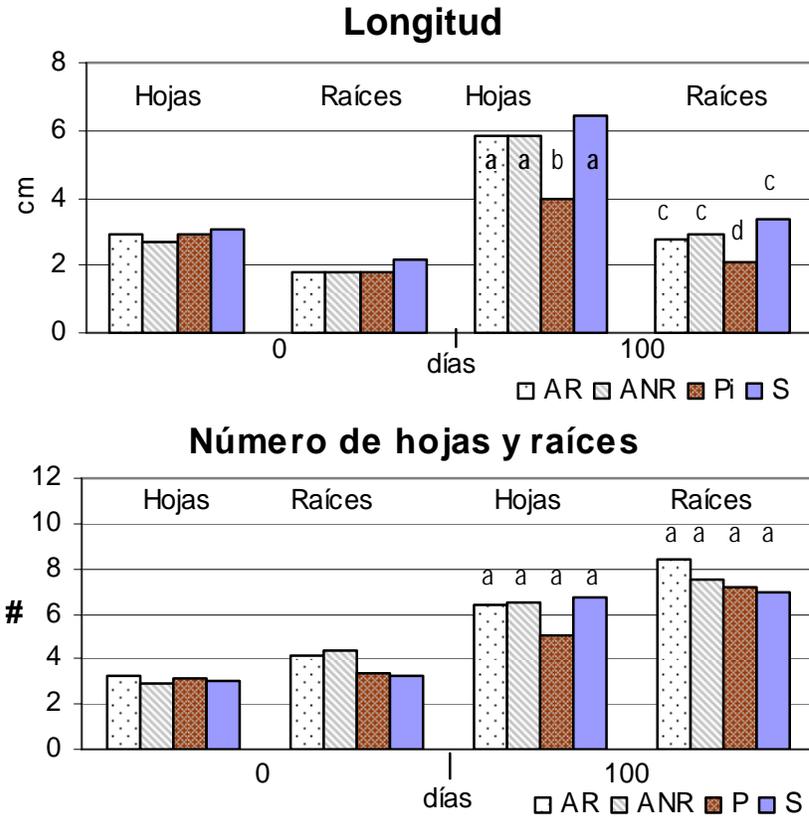


Fig. 26. Efecto de los tratamientos con carbohidratos sustitutos sobre el desarrollo *in vitro* de las plántulas de *Laelia anceps* subsp. *anceps*. AR= Azúcar Refinada; ANR= A. No Refinada; Pi= Piloncillo; S= Sacarosa. Las letras sobre las barras indican las similitudes estadísticas entre los tratamientos, las barras con la misma letra, son iguales estadísticamente.

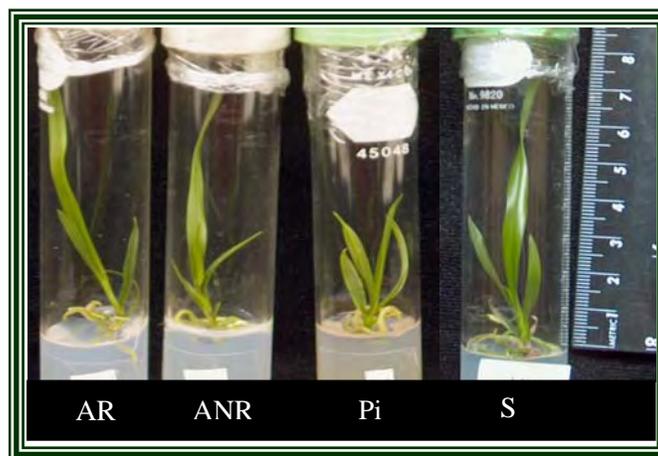


Fig. 27. Plántulas de *Laelia anceps* subsp. *anceps* desarrolladas después de 100 días de cultivo en los tratamientos con azúcar refinada (AR), azúcar no refinada (ANR), piloncillo (Pi) y sacarosa (S).

El azúcar más utilizado para la elaboración del medio de cultivo *in vitro* es la sacarosa (Hazarika, 2003; Hartman *et al.*, 1990), este carbohidrato es esencial en el medio para muchas especies vegetales; en algunos casos no es posible observar el crecimiento de las plántulas en medios sin azúcar durante el enraizamiento (Hazarika, 2003).

La utilización de sacarosa (2-4%) como fuente de carbohidrato durante el cultivo *in vitro* previo al proceso de aclimatización, favorece un mayor crecimiento de las plántulas y el almacenamiento de almidón como reserva energética en esta etapa, así como un mayor porcentaje de supervivencia, mayor crecimiento y mejor capacidad fotosintética de las plántulas durante el proceso de aclimatización (Kadlecek *et al.*, 2001; Hazarika, 2003)

BALANCE ECONÓMICO DE LA SUSTITUCIÓN DE SALES BASALES Y SACAROSA

Dentro de los componentes del medio de cultivo MS se tienen vitaminas, agar gel, sales basales MS y sacarosa grado analítico. El costo de las vitaminas empleadas para preparar 1 L de medio es poco significativo (debido a que se suplementan en concentraciones muy diluidas), mientras que esto no sucede con el resto de los componentes:

Sales basales MS	= \$ 48.00 M.N.	(Sigma, 2006 Clave M 5524)
Sacarosa grado analítico	= \$ 9.00 M.N.	(Sigma, 2006 Clave S 5391)
Agar gel	= <u>\$ 18.00 M.N.</u>	(Sigma, 2006 Clave A 3301)
Total= \$ 75.00 M.N.		

Así entonces, el costo calculado para preparar un litro de medio es de \$75.00.

El precio de los fertilizantes Peters y Folifétil en la presentación de 1 Kg, al igual que el Floren de 1L es de \$30; la sustitución de estas sales en los tratamientos con la concentración al 100% (5 g/L o 10mL/L respectivamente) tiene un costo por litro de \$ 0.15 y \$0.3, de forma que al sumar los \$9 de la Sacarosa grado analítico y los \$18 del agar, el costo total es de cerca de \$27/ L, con lo cual se logra un ahorro del 64%.

Por otro lado, el precio del azúcar refinado, el azúcar no refinado y el piloncillo se encuentra entre \$10 y \$15. Para preparar 1L de medio se necesitan 30 gr de sacarosa, así que al sustituirla por cualquiera de estos azúcares caseros el costo se reduce a \$0.30 - \$0.36.

Si sustituimos al mismo tiempo las sales basales y la sacarosa, el costo se reduciría en un 75%, con un valor de \$ 18.5 por cada litro:

Fertilizante	= \$ 0.15
Azúcar Refinada	= \$ 0.36
Agar Gel	= <u>\$ 18.00</u>
Total= \$ 18.51	

ACLIMATIZACIÓN SUPERVIVENCIA DE PLANTAS

Después de 100 días en el proceso de aclimatización se obtuvo una supervivencia total de las plantas de *Laelia anceps* del 98%. El 2% de mortalidad fue registrado en el tratamiento con botellas en donde fueron colocadas plantas grandes sobre la mezcla de sustrato estéril (BEG).

Previo a la esterilización de la mezcla, los sustratos, Agrolita y *Sphagnum*, fueron mezclados y humedecidos para lograr una esterilización homogénea. Debido a este procedimiento se observó que luego de la esterilización, se facilitó la absorción y retención de agua por parte del sustrato.

Por otro lado, las botellas PET conservaban una mayor cantidad de humedad y la mezcla contenida en ellas permaneció mojada por más tiempo que en las cajas de unicel debido a su menor tamaño y tener una menor superficie para la pérdida de humedad. De esta forma, las botellas con mezcla esterilizada fueron las que retuvieron agua por más tiempo y en mayor cantidad. Esto provocó la aparición de hongos, principalmente en aquellas botellas que contenían mezcla previamente esterilizada, y la muerte de las plantas fue provocada por la presencia de los hongos y la gran cantidad de humedad en el sustrato.

Damon y colaboradores (2005) reportan porcentajes de mortalidad del 60 al 90% en la aclimatización de diferentes especies de orquídeas como *Cattleya aurantiaca*, *Cattleya skinneri*, *Brassavola nodosa*, *Prostehea chacaoensis*, *Encyclia cordigera*, *Anathallis racemiflora* y *Cynoches ventricosum*.

Butcher y Marlow (1989) aclimatizaron plántulas de doce meses de *Cattleya dowiana* var. Aurea Batem en una mezcla de corteza, carbón y vermiculita.

Stenberg y Kane (1998), aclimatizaron plántulas de 1 cm de longitud de *Encyclia boothiana* en los sustratos esterilizados Metro Mix 300, Corteza de abeto (CZ), musgo

Sphagnum (S) y la mezcla de CZ-S 3:1 obteniendo 89, 42, 33 y 25 % de mortalidad respectivamente, el sustrato Metro Mix permaneció húmedo por periodos prolongados, provocando la pérdida de las raíces de muchas plantas y su muerte, la corteza provocó un estrés hídrico a las plantas. Por otro lado, las plántulas con mejor apariencia, mayor tamaño, peso fresco, número de hojas y raíces fueron obtenidas en musgo *Sphagnum*.

Para aclimatizar plántulas de *Laelia autumnalis* con seis meses de cultivo *in vitro* y 5 cm de talla, Sierra (2006) utilizó las mezclas de sustratos esterilizadas: A-S (2:1), CA-S (2:1), T-S (2:1), CA-A-S 1:1:1, CA-T-S 1:1:1, y T-A-S 1:1:1. En estas obtuvo porcentajes de mortalidad de 37 a 77 %, el porcentaje más bajo resultó en agrolita-*Sphagnum* (2:1), mayor peso fresco, longitud de hojas y de raíces.

Lo y colaboradores (2004) emplearon musgo *Sphagnum*, rizoma de helecho arborescente y la mezcla de ambos, en el proceso de aclimatización de *Dendrobium tosaense*; encontraron que con el musgo *Sphagnum* y en la mezcla con helecho arborescente se desarrollaron plantas de mayor tamaño, peso fresco, número y longitud de raíces y mayor porcentaje de supervivencia (64-97 %). El menor porcentaje de supervivencia se presentó en helecho arborescente (20-43 %).

DESARROLLO DE PLANTAS

La altura promedio de las plantas (8 cm aprox.) (Figura 28) y el número de hojas (entre 6 y 8 en promedio) por planta (Figura 29) fueron homogéneos para las plantas de talla grande cultivadas en los dos tipos de contenedor, aunque se observaron valores ligeramente más elevados para el número de hojas en las plantas sembradas en botellas con mezcla estéril.

La longitud de las plantas de talla chica (Figura 28) igualmente fue homogénea, con alrededor de 4.5 cm. El mayor número de hojas promedio (4.7) se registro en las Botellas con sustrato No Esterilizado (BNE) (Figura 29).

En las plantas de talla grande las raíces más largas (5.8cm) se desarrollaron en las cultivadas en las cajas con sustrato esterilizado (CE) seguidas de las cajas con sustrato no esterilizado (CNE) (Figura 28), aunque estadísticamente los tratamientos BE, CE y CNE no presentaron diferencias significativas. Para las plantas de talla chica, las raíces de mayor longitud (Figura 28) se desarrollaron en BNE y en las botellas con sustrato esterilizado (BE) (3.5cm), estadísticamente todos los tratamientos fueron similares.

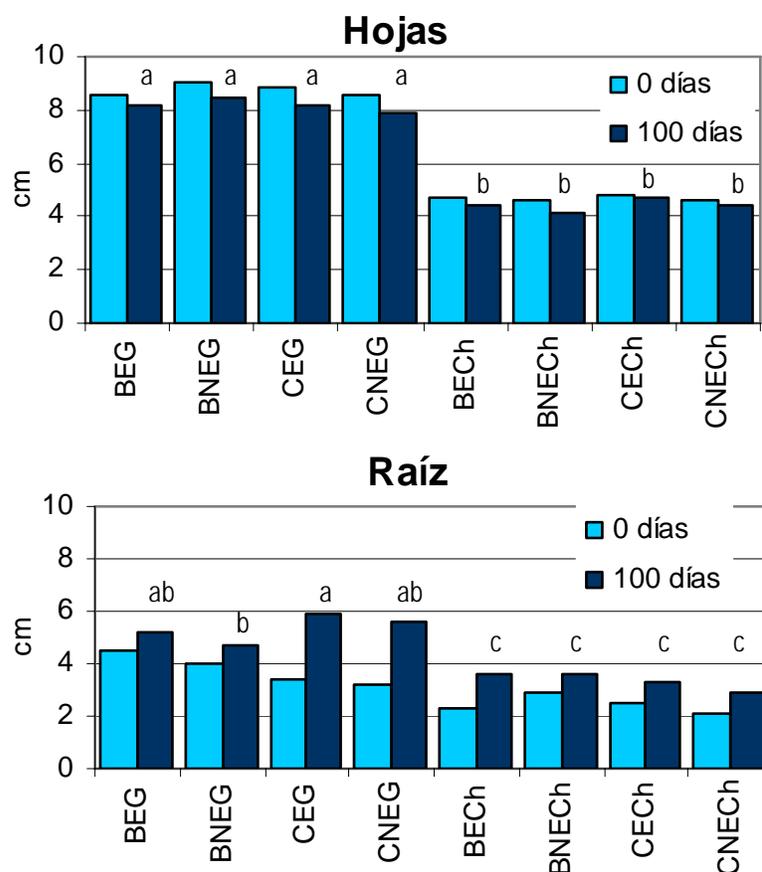


Fig. 28. Efecto de los tratamientos utilizados para la aclimatización sobre el crecimiento de plantas de *Laelia anceps* subsp. *anceps*. B= Botella; C= Caja de unicel; E= Sustrato estéril; NE= S. no estéril; G= plantas de talla grande; Ch= talla chica. Las letras sobre las barras indican las similitudes estadísticas entre los tratamientos, las barras con la misma letra, son iguales estadísticamente.

El número de raíces por planta (Fig.29) es similar estadísticamente en los cuatro tratamientos con plantas grandes, sin embargo, se aprecia un mayor número en CE. En las plantas de talla chica también se observaron resultados similares estadísticamente, aunque el tratamiento BNE exhibió la menor cantidad de raíces por planta. En la figura 30 se observan plántulas de *Laelia anceps* subsp. *anceps* aclimatizadas.

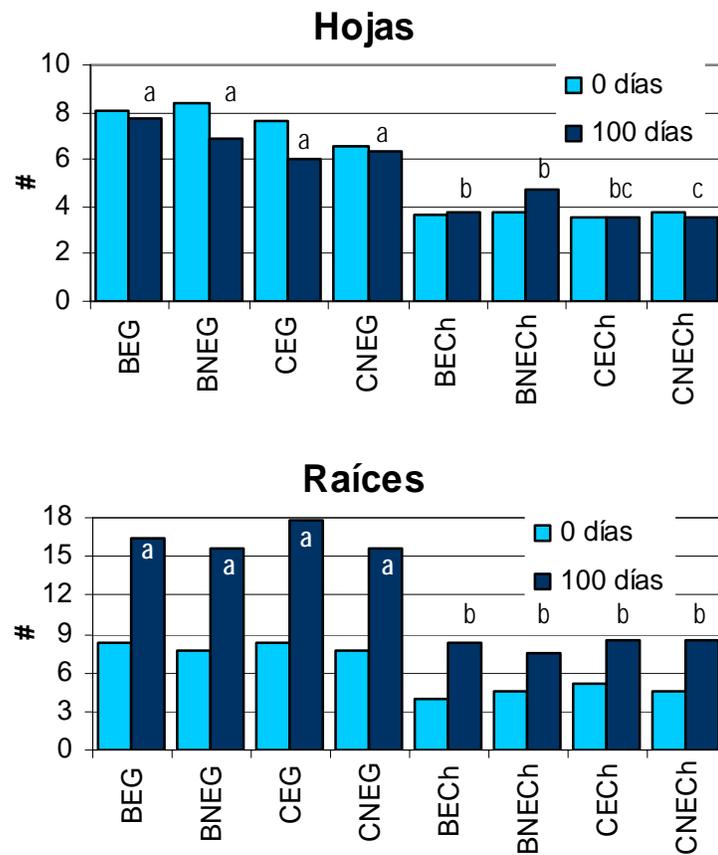


Fig. 29. Efecto de los tratamientos utilizados durante la aclimatización, sobre el desarrollo de plantas *Laelia anceps* subsp. *anceps*. B= Botella; C= Caja de unicel; E= Sustrato estéril; NE= S. no estéril; G= plantas de talla grande; Ch= talla chica. Las letras sobre las barras indican las similitudes estadísticas entre los tratamientos, las barras con la misma letra, son iguales estadísticamente.



Fig. 30. Plántulas de *Laelia anceps* subsp. *anceps* aclimatizadas después de 100 días en cada uno de los tratamientos.

El peso fresco entre las plantas de talla grande y el peso entre las de talla chica fue similar estadísticamente en todos los tratamientos (Figura 31). Con las plantas de talla grande hubo mayor variación, el valor más alto (1.7gr) se registró en CE y el más bajo (1.3gr) en BNE.

La presencia de pseudobulbos en las plantas de talla grande resultó igual en los cuatro tratamientos con un promedio de dos pseudobulbos por planta, estas estructuras presentaron una longitud promedio de 1.3 cm y ancho de 0.3 cm. En la talla chica, la cantidad de pseudobulbos generados fue muy pequeña y no resultó representativa.

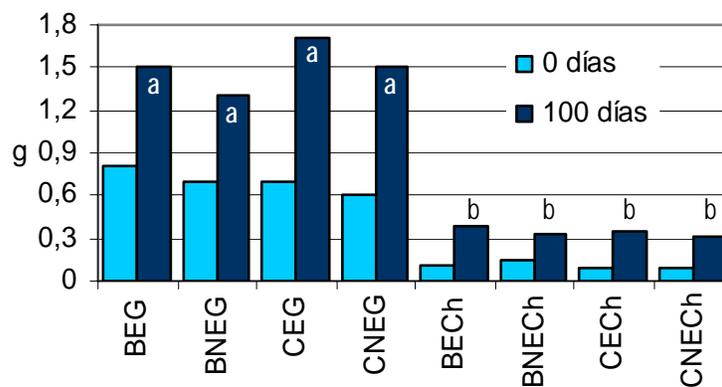


Fig. 31. Efecto de los tratamientos utilizados durante la aclimatización, sobre el peso fresco de *Laelia anceps* subsp. *anceps*. B= Botella; C= Caja de unicel; E= Sustrato estéril; NE= S. no estéril; G= plantas de talla grande; Ch= talla chica. Las letras sobre las barras indican las similitudes estadísticas entre los tratamientos, las barras con la misma letra, son iguales estadísticamente.

La diferencia entre las tallas de las plantas chicas (4.5 cm) y plantas grandes (8.5 cm) no fue un factor determinante en la aclimatización de las plantas de *Laelia anceps* subsp. *anceps*. Ya que ambas se establecieron satisfactoriamente al proceso de aclimatización, además de que presentaron un desarrollo similar para los parámetros evaluados.

Kadlecek y colaboradores (2001) mencionan que el tamaño del área foliar en el principio de la aclimatización es muy importante para el tamaño del área foliar al final del proceso, mientras más grande sea el área foliar, se dará una mejor respuesta a la aclimatización.

Las condiciones especiales durante el cultivo *in vitro* diseñadas para producir el mínimo estrés y proveer las condiciones óptimas provocan la formación de plántulas con morfología, anatomía y fisiología anormales. Durante la transferencia *in vitro* estas plántulas pueden dañarse fácilmente por cambios ambientales bruscos, de manera que es necesario un periodo de aclimatización para corregir las deficiencias (Pospisilova *et al.*, 1999; Hazarika, 2003).

La mezcla agrolita-*Sphagnum* (1:1) resultó sustrato adecuado por su capacidad de retención de agua, drenaje y porosidad, así como proveer de buen soporte para las plantas en la aclimatización de *Laelia anceps* subsp. *anceps*. El porcentaje de supervivencia alcanzado en esta mezcla fue más alto que cualquiera encontrado en la literatura.

Durante la aclimatización las plantas no presentaron síntomas graves de deshidratación, solamente se marchitaron los ápices de las hojas. Estos resultados se obtuvieron a pesar de que las condiciones ambientales de la ciudad de México son menos húmedas y cálidas que las encontradas en el hábitat natural de *L. anceps*. Esta especie habita bosques de encino cálidos con una humedad relativa elevada, preferiblemente en altitudes de 900-1500 m con una precipitación anual de 1200-2100mm (Halbinger y Soto, 1997), soporta temperaturas desde 0 hasta 38° C por periodos cortos de tiempo (Mc Donald, 1999)

Fila y colaboradores (1998) mencionan que inmediatamente después del trasplante se observa comúnmente el marchitamiento debido al bajo contenido de agua en las plantas. A pesar de que el potencial de agua del sustrato es mayor que el potencial del medio de cultivo con sacarosa, las plántulas pueden morir si la pérdida de agua a través de sus hojas no se restringe. La disponibilidad de agua puede estar limitada debido a la baja conductividad hidráulica de las raíces y conexiones raíz-tallo (Fila *et al.*, 1998). Adicionalmente, el retraso en el desarrollo *in vitro* de la cutícula, ceras epicuticulares y de un aparato estomático funcional provoca elevadas tasas de transpiración estomatal por parte de las hojas extraídas de *in vitro* a *ex vitro*. Durante la aclimatización a condiciones *ex vitro* la tasa de transpiración comúnmente decrece debido a que la regulación estomática es más efectiva y la cutícula y ceras cuticulares son desarrolladas. De igual forma se incrementan los contenidos de clorofila a y b (Pospisilova *et al.*, 1999).

CONCLUSIONES

El medio de cultivo MS promueve la germinación de semillas de *Laelia anceps* subsp. *anceps* y favorece el desarrollo de estadios más avanzados.

El medio de cultivo KC, formulado especialmente para la germinación de orquídeas, estimula la germinación en la mayoría de las semillas de *Laelia anceps* subsp. *anceps* pero únicamente hasta el estadio de protocormos cloróticos.

La concentración al 100 % de las sales basales MS favorece el estadio de desarrollo más avanzado, plántulas con raíces, y el aumento en la biomasa de las plántulas *in vitro* durante los primeros nueve meses de cultivo.

Al utilizar el medio MS, al 50% de la concentración de sus sales, se genera un mayor desarrollo radicular, así que sería recomendable subcultivar en este medio las plántulas obtenidas en MS 100, durante el último mes antes de la aclimatización *ex vitro* con el fin de generar un mejor sistema radical.

El uso de fertilizantes comerciales en la propagación de *Laelia anceps* subsp. *anceps* favorecen el desarrollo de las plántulas. Los fertilizantes Peters 24-8-16 y Floren 10-15-5 favorecen más el desarrollo y vigorosidad de las plántulas que el inducido por el medio MS.

Los azúcares de uso casero, azúcar refinada o azúcar no refinada, utilizados como fuente de carbohidratos sustitutos en el medio de cultivo con sales basales MS inducen el desarrollo de las plántulas de forma similar a la sacarosa grado analítico.

Las plántulas cultivadas con piloncillo como fuente de carbohidratos se desarrollan saludablemente, sin embargo, su crecimiento es muy lento comparado con las cultivadas con los otros azúcares.

La sinergia de las sales minerales de los fertilizantes comerciales y la fuente de carbohidratos proveniente del azúcar de mesa estimulan el desarrollo acelerado de las plántulas y disminuye en un 75% los costos de elaboración del medio de cultivo para la propagación *in vitro* de la orquídea *Laelia anceps* subsp. *anceps*.

La mezcla agrolita-*Sphagnum* (1:1) es un excelente sustrato para lograr la aclimatización de las plántulas de *Laelia anceps* subsp. *anceps* obtenidas *in vitro*.

El control fitosanitario de las plantas aclimatizadas en la mezcla de sustrato esterilizado es difícil, ya que la previa esterilización facilita la absorción y retención de agua, lo que favorece el continuo desarrollo de hongos.

El uso de contenedores reciclados, como cajas de unicel y botellas PET, es adecuado para el manejo de las plantas de *Laelia anceps* subsp. *anceps* durante el proceso de aclimatización *ex vitro*, además de que se economiza en costos.

Las cajas de unicel al tener una mayor superficie facilita el control de la humedad en el sustrato y facilita el manejo de una mayor cantidad de plantas.

Es factible realizar el establecimiento *ex vitro* de esta especie con plántulas de 4.5 cm y de 8.5 cm de altura obtenidas *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, C. 1991. Mecanismos de absorción foliar de nutrimentos. Universidad Autónoma Chapingo. México. 33 p.
- Adelberg, J.; N. Desamero; A. Hale & R. Young. 1997. Long-term nutrient and water utilization during micropropagation of *Cattleya* on a liquid/membrane system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 48: 1-7
- Alexander, C. & G. Hadley. 1984. The effect of mycorrhizal infection of *Goodyera repens* and its control by fungicide. *New Phytologist*. 97: 391-400
- Alexander, C.; I. Alexander & G. Hadley. 1984. Phosphate uptake in relation to mycorrhizal infection. *New Phytologist*. 97: 401-411
- Arditti, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. *The Botanical Review*. 33 (1): 1-97
- Arditti, J.; A. Clements; G. Fast; G. Hadley; G. Nishimura & R. Ernst. 1982. *Orchid Biology. Reviews and perspectives II*. Cornell University Press. Ithaca. 390 p.
- Arditti, J. & R. Ernst. 1984. Physiology of Orchid seed germination. En: J. Arditti, *Orchid Biology. Review and perspectives III*. Cornell University Press. Ithaca, USA: 177-222
- Arditti, J. & R. Ernst. 1986. Some structural and physiological features which facilitate the survival orchids. En: *Proceedings of the 11th World Orchid Conference*: 102-105
- Arditti, J. & R. Ernst. 1993. *Micropropagation of Orchids*. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA. 682p
- Baker, M. & C. Baker. 1998. *Orchid species culture: Pleione, Pescatorea, Pharus, Phalaenopsis, Pholidota and Phragmipedium*. Timber Press. Portland, USA. 250 p.
- Baker, K.; M. Mathes & B. Wallace. 1987. Germination of *Ponthieva* and *Cattleya* seeds and development of *Phalaenopsis* protocorms. *Lindleyana*. 2 (2): 77-124
- Barba, A.; S. Luna & J. Romero. 2001. Micropropagación de plantas. *Trillas*. México. 107 p.
- Barba, A; S. Luna & J. Romero. 2002. *Orquideología básica*. Biotemas. Unidad de Investigación en Biología Vegetal. FES Zaragoza. UNAM. México. 18 p

- Barrera, D.; V. Chávez & E. Sandoval. 2005. Propagación *in vitro* vía organogénesis indirecta de *Laelia speciosa* L. (Orchidaceae) especie en peligro de extinción. En: XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Mérida, Yucatán.
- Behar, M. 1998. Orchid growing from seed made easy. American Orchid Society. Orchids. 67:1040-1042
- Benzing, D. 1981. Why is Orchidaceae so large, its seeds so small, and its seedlings mycomorphic?. Selbyana. 5 (3-4):241-242
- Bristow, A. 1985. Orchids. Wing King Tong Co. Ltd. Hong Kong, China. 64 p
- Butcher, D. & S. Marlow, 1989. Asymbiotic germination of epiphytic and terrestrial orchids. En: H. Pritchard, Modern methods in orchid conservation; the role of physiology, ecology and management. Cambridge University Press. Cambridge, USA. 173 p.
- Buyun, L.; A. Lavrentyeva; L. Kovalska & R. Ivannikov. 2004. *in vitro* germination of some rare tropical orchids. Acta Universitatis Latviensis. Biology. 676: 159-162
- CONABIO, 1998. La diversidad biológica en México: Estudio de país. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 341 p.
- Curtis, J. & E. Sporel. 1948. Studies on the nitrogen nutrition of orchid embryos: II. Comparative utilization of nitrate and ammonium nitrogen. American Orchid Society. Bull. 17: 111-114
- Damon, A.; M. Pérez & M. Rivera. 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
- Do Valle, L. & R. Tadeu. 2005. *in vitro* propagation of brazilian orchids using traditional culture media and comercial fertilizers formulations. Acta Scientiarum. Agronomy Maringá. 27 (1):1-5
- Domínguez, A. 1989. Tratado de fertilización. Mundi prensa. 2a ed. Madrid. 601 p.
- Dressler, R. 1981. The Orchids; Natural History and classification. Harvard University Press. Cambridge, USA. 332 p
- Dressler, R. 1990. The Orchids; Natural history and classification. Smithsonian Institution. USA. 332 p

- Dressler, R. 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. Cambridge University Press. Portland, USA. 314 p
- Espejo, A.; J. García; A. López; R. Jiménez & L. Sánchez. 2002. Orquídeas del estado de Morelos. Orquídea (Mex.)XVI. Herbario AMO y Universidad Autónoma Metropolitana. México. 332 p.
- Espinosa, J. 1997. Fertilización química y biológica de tres híbridos de orquídeas en condiciones de invernadero. Tesis. Colegio de postgraduados. Montecillo, México.
- Espinosa, J.; A. Gaytán; E. Becerril; D. Contreras & C. Trejo. 2000. Fertilización química y biológica de *Phalaenopsis* (Orchidaceae) en condiciones de invernadero. Terra. 18 (2): 125-131
- Fila, G.; J. Ghashghaie; J. Hoarau & J. Cornic. 1998. Photosynthesis, leaf conductance and water relations of *in vitro* cultured grapevine rootstock in relation to acclimatization. Physiol. Plant. 102: 411-418
- Frei, S. & C. Dodson. 1972. The chemical effect on certain bark substrates on the germination and early growth of epiphyte orchids. Bull. Torr. Bot. Club. 99 (6): 301-307
- García, M. & M. Cuevas. 2000. Abonos, fertilizantes y aplicación. En: García, D.; J. Arceo & I. Miranda, Apuntes de agronomía II. Capítulo 6. Universidad Autónoma Chapingo. México: 156-167
- Hadley, G. 1982. Orchid mycorrhiza. En: J. Arditti, Orchid biology. Review and perspectives III, Cornell University Press. Ithaca, USA: 83-118
- Hadley, G. & G. Pegg. 1989. Host-fungus relationships in orchid mycorrhizal systems. In: H. Pritchard. Modern methods in orchid conservation; the role of physiology, Ecology and management. Cambridge University Press. Cambridge, USA. 173 p.
- Hágsater, E. & M. Soto. 1998. Orchid Conservation in Mexico. Selbyana.19 (1):15-19
- Hágsater, E.; M. Soto; A. Salazar; R. Jiménez; A. López, & R. Dressler. 2005. Las Orquídeas de México. Instituto Chinoín. México. 304 p.
- Halbinger, F. & M. Soto. 1997. Laelias of Mexico. *Orquídea* (Méx.) XV. México. 160 p.
- Harrison, C. & J. Arditti. 1978. Physiological changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). Bot. Gaz. 139: 180-189

- Hartman, W. 1992. Las orquídeas de Chiapas. Gobierno del estado de Chiapas. 40p.
- Hartman, H.; D. Kester & F. Davies. 1990. Plant propagation, Principles and practices. 5^a ed. Prentice Hall. Englewood, USA. 647 p
- Hazarika, B. 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. Current science. 85 (12): 1704-1712
- Hernández, M. 1992. Dinámica poblacional de *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. (Orchidaceae). Tesis, Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Hew, C. 1987. Respiration in orchids. En: J. Arditti, Orchid Biology, Reviews and Perspectives IV. Cornell University Press. Ithaca, USA: 227-259
- Hew, C. & J. Yong. 2004. The physiology of tropical orchids in relation to the industry. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Singapore. 370 p
- Hicks, A. 2000. Asymbiotic technique of orchid seed germination. The Orchid Seedbank Project. Chandler, USA. 134p.
- Hicks, A. 2005. Propagation of orchids from seeds. The Orchid Review. 113 (1264):200-203
- Ichihashi, S. 1979. Studies on the media for orchid seed germination. Journal Japanese Society for Horticultural Science. 48 (3): 345-352
- JiuZhou, Z. 2005. Studies on optimized fertilization for *Cymbidium hybridum*. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis. 27 (4): 553-556
- Kadlecek, P.; I. Tichá; D. Haisel; V. Capkova & C. Schäfer. 2001. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. Plant Science. 161: 695-701
- Kishi, F. & K. Tagaky. 1997. Analysis of medium components used for orchid tissue culture. Linleyana. 12 (3): 158-161
- Klerk, G. 2000. Rooting treatment and the *ex vitro* performance of micropropagated plants. Acta Horticulturae. 530: 277-288
- Knudson, L. 1922. Non symbiotic germination of orchid seeds. Bot. Gaz. 73: 1-25
- Knudson, L. 1951. Nutrient solutions for the germination of orchid seeds. Bot Gaz. 112: 528-532
- La garde, R. 1929. Non symbiotic germination of orchids. Ann. Missouri Bot. Gard. 16: 499-515

- Li Loo Kung, C. 2002. La ingeniería de los alimentos y el proceso de refinación de azúcar. Memoria descriptiva para examen de suficiencia profesional. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Iquitos, Perú. 69 p
- Llurba, M. 1997. Parámetros a tener en cuenta en los sustratos. Horticultura. 125
- Lo, S.; S. Nalawade; C. Kuo; C. Chen & H. Tsay. 2004. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and ex vitro establishment of plants of *Dendrobium tosaense* makino – a medicinal important orchid. In Vitro cell. Dev. Biol.Plant. 40: 528-535
- Madison, M. 1977. Vascular epiphytes: their systematic occurrence and salient features. Selbyana. 2 (1): 1-13
- Manning, J. & J. Van Staden. 1987. The development and mobilization of seed reserves in some African orchids. Aust. J. Bot. 35: 343:353.
- Manrique, L.1993. Greenhouse crops: a review. Journal of Plant Nutrition. 16 (12): 2411-2477
- Maroto, J. 1990. Elementos de horticultura general. Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Mc Donald, E. 1999. Orthos. All About Orchids. Meredith Books. Des Moines, USA. 96p
- McKendrick, S. 2000. Manual para la germinación in vitro de orquídeas. Ceiba Foundation for Tropical Conservation. Quito, Ecuador. 17p
- Moraes, L.; R. Faria & F. Cuquel. 2005. Activated charcoal for *in vitro* propagation of Brazilian Orchids. ISHS Acta Horticulturae 683: V International Symposium on New Floricultural Crops.
- Ortiz, M. 2001. Viabilidad de las semillas de tres especies de orquídeas del Valle de Tehuacán, Puebla, bajo condiciones de almacenamiento. Tesis. FES Iztacala, UNAM. México.
- Pateli, P. 2003. Influence of *in vitro* culture medium on *Epidendrum radicans* seed germination, seedlings growth and *ex vitro* establishment. ISHS Acta Horticulturae 616: I International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants.
- Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Mundi Prensa. Madrid, España: 127-132

- Poole, H. & J. Seeley. 1978. Nitrogen, potassium and magnesium nutrition of three orchid genera. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 103: 485-488
- Poole, H. & T. Sheenan. 1980. Mineral nutrition of Orchids. En: J. Arditti, *Orchid Biology. Review and perspectives II.* Cornell University Press. Ithaca, USA: 195-212
- Pospisilova, J.; I. Ticha; P. Kadlec; D. Haisel & S. Plzakova. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42 (4): 481-497
- Raghavan, V. & J. Torrey. 1964. Inorganic nitrogen nutrition of the seedlings of the orchid, *Cattleya*. *Amer. J. Bot.* 51: 264-274
- Ramamoorthy T.; R. Bye; A. Lot & J. Fa. 1993. Biological diversity of Mexico: origins and distribution. Oxford University Press. New York, USA. 812 p.
- Ramírez, J. 1996. Orquídeas. En: Biodiversitas. Boletín bimestral de la CONABIO. 2 (1): 1-5
- Rasmussen, H. 1995. Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant. Cambridge University Press. Cambridge, USA.
- Rentoul, J. 1987. The specialist orchid grower. Timber Press. Portland.
- Sarmiento, P. y G. Romero. 2000. Orquídeas mexicanas. Grupo Editorial Miguel Ángel Porrúa. México. 147 p.
- Santos, L.; M. Martínez; J. Campos & E. Aguirre. 2005. *in vitro* propagation of *Laelia albida* (Orchidaceae) for conservation and ornamental purposes in Mexico. *Hortscience* 40 (2): 439-442
- Seaton, P. & M. Ramsay. 2005. Growing orchids from seeds. Royal Botanical Garden, Kew. London, England. 83 p.
- Sessler, J. 1978. Orchids and how to grow them. Prentice Hall. Englewood, USA. 370 p
- Shushan, S. 1959. Developmental anatomy of an orchid, *Cattleya x Trimos*. En: Withner, L, *The Orchids*. Ronald Press Co. New York, USA: 45-72
- Sierra, H. 2006. Germinación *in vitro* y adaptación *ex vitro* de *Laelia autumnalis* (La Llave & Lexarsa) Lindl. (Orchidaceae). Tesis. FES Zaragoza, UNAM. México. 117 p.
- Sigma. 2006. Bioquímicos, reactivos y kits para investigación en ciencias de la vida. Catálogo 2006-2007. Sigma-Aldrich Co. Toluca, México.

- Singh, F. 1981. Differential staining of orchid seeds for viability testing. American Orchid Society Bulletin. 50: 416-418
- Smith, F. 1932. Raising orchid seedlings asymbiotically under tropical conditions. Gard. Chron. 91: 9-11
- Soberón, M. & J. Llorente. 1993. La Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad de México (CONABIO). Rev. Soc. Mex. Hist. Nat. 44: 3-17
- Soto, M. 1998. Listado actualizado de las orquídeas de México. Orquídea. 11: 233-277
- Soto, M. & E. Hágsater. 1990. Algunas ideas acerca de la conservación de las orquídeas mexicanas y un listado preliminar de los taxa amenazados. En: J. Campillo Y F. Rivera (eds.), Áreas naturales protegidas en México y especies en Extinción. UNAM. México: 155-172
- Sriskandarjhi, S. & R. Skirvin. 1991. Effect of NH_4NO_3 level on *philodendron* root development *in vitro*. HortTech. 1:37-38
- Stancato, G.; E. Pereira & P. Mazzafera. 1998. Development and Germination of seeds of *Laelia purpurata* (Orchidaceae). Lindleyana. 13 (2): 97-100.
- Stancato, G. & R. Faria. 1996. In vitro growth and mineral nutrition of the lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* Batem. (Orchidaceae) I: Effects of macro and microelements. Linleyana. 11 (1): 41-43
- Stenberg, M. & M. Kane. 1998. *in vitro* germination and greenhouse cultivation of *Encyclia boothiana* var. *Erythronioides*, an endangered Florida orchid. Lindleyana 13 (2): 101-112
- Stoutemeyer, V. & R. Cooke. 1989. Orchid flasking simplified. American Orchid Society Bulletin 59: 572-578
- Téllez, M. 2003. La etnobotánica de la familia Orchidaceae en México. En: Montufar, L. (Comp). Estudios etnobiológicos. Pasado y presente en México. INAH - Conaculta. México: 163-169
- Terres, V.; A. Artetxe & A. Beunza. 1997. Caracterización física de los sustratos de cultivo. Horticultura. 125
- Toledo, M. 1988. La diversidad biológica de México. Ciencia y Desarrollo. 14 (81): 17-30.

- Toledo, M. 1994. La diversidad biológica de México. Nuevos retos para la investigación en los noventas. *Ciencias*. 34:43-59
- Uosukainen, M.; S. Rantala; A. Manninen & M. Vestberg. 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
- Van Waes, J. & P. Debergh. 1986. Adaptation of the tetrazolium method for testing the seed viability, and scanning electron microscopy study of some Western European orchids. *Physiology of Plants*. 66: 435-442
- Vujanovic, V.; M. St-Arnaud; D. Barabé & G. Thibeault. 2000. Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. *Annals of Botany*. 86: 79-86
- Wang, Y. & L. Gregg. 1994. Medium and fertilizer affect the performance of *Phalaenopsis* orchids during two flowering cycles. *HortScience*. 29 (4): 269-271
- Warren, R. 1989. A private conservation project in the coastal rainforest in Brazil: the first ten years. En: H. Pritchard, *Modern methods in orchid conservation; the role of physiology, ecology and management*. Cambridge University Press. Cambridge, USA. 173 p.
- Warren, R. & D. Miller. 1993. Re-establishment of *Laelia crispa* (part 2). *American Orchid Society Bulletin*. 62: 387-389
- Williams, N. 1982. The biology of orchids and euglossine bees. En: J. Arditti, *Orchid biology. Reviews and perspectives II*. Cornell Univ. Press. Ithaca, USA: 119-171
- Yanagawa, T.; M. Nagai.; T. Ogino & R. Maeguchi. 1995. Application of disinfectants to orchid seeds, plantlets and media as a means to prevent *in vitro* contamination. *Lindleyana*. 10 (1): 33-36
- YunZhai & SiQing. 2005. Effects of N, P, K on floral bud differentiation and flower quality of *Cymbidium hybridum*. *Journal of Beijing Forestry University*. 27 (3): 76-78

Referencias electrónicas.

- Aceves, J. 2000. Uso sustentable de diversas orquídeas en peligro de extinción, con base biotecnológica, en la región de los Tuxtlas. Revista ciencia administrativa. [En línea]. Disponibilidad: <<http://www.uv.mx/iiesca/revista2000/orquideas.html>>[15 de enero de 2006]
- Castedo, J. 2007. Alimentos. Panela-Chancaca de caña de azúcar [En línea]. Disponibilidad: <<http://ccbolgroup.com/chancaca.html>> [18 de octubre de 2007]
- NOM-059-ECOL-2000. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2000, que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestres terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial, y que establece especificaciones para su protección. Secretaría de Desarrollo Social [En línea]. Disponibilidad: <<http://www.semarnat.com/Conabio-PROY-NOM-059-ECOL-2001.html>>(15 de enero de 2006)
- Wikipedia: La enciclopedia libre. 2007. Azúcar [En línea]. Disponibilidad: <<http://es.wikipedia.org/wiki/Az%C3%BAcar>> [18 de octubre de 2007]

ANEXO 1

INFORMACIÓN COMERCIAL DE LOS FERTILIZANTES UTILIZADOS

PETERS PROFESSIONAL ® 24-8-16

Página de Internet: www.scottsprohort.com/productsfertilizers/peters-pro.cfm

FOLIFÉRTIL ® 20-30-10

Agroquímicos especializados S. A.

Dirección: Narciso Mendoza s/n esq. Aquiles Serdán. San Pedro Atzompa, hacienda Ojo de Agua. Tecamac, Estado de México, México.

Teléfonos: 01 (915) 58 69 633; 01 (915) 93 84 539

Registro clave: RACO3110/XII/94

FLOREN ® 10-15-5

Agroquímica Tridente S.A. de C.V.

Dirección: Heriberto Frías # 1529-703. Colonia del Valle. C.P. 03100. D.F., México.

Teléfonos: 01 (55) 56 88 79 11; 01 (55) 56 88 77 10. Ventas extensiones 106, 107 y 108. Fax extensión 120.

Email: tridente@prodigy.net.mx

Registro clave: RSCO-0084/XI/96

ANEXO 2

SIMILITUDES ESTADÍSTICAS ENTRE LOS TRATAMIENTOS DE LA ETAPA DE GERMINACIÓN

Los estadíos de desarrollo para cada uno de los tiempos reportados se denotan con las abreviaturas: 2hcr= 2 hojas con raíces; 2h= 2 hojas; 1h= 1 hoja; Ph= Primordio de hoja; Pcf= Protocormo clorofílico; Brm= Brotación múltiple; ct= P. clorótico. Las letras que acompañan cada porcentaje indican las similitudes estadísticas entre los tratamientos.

97 DÍAS

Estadío	TRATAMIENTO			
	MS 50	KC 50	KC 100	MS 100
Pcf	31 % b	72 % a	37 % b	70 % a
ct	27 % b	9 % c	47 % a	8 % c
Brm	0 % a	0 % a	0 % a	0 % a
Ph	12 % a	9 % b	10 % ab	17 % a
1h	14 % a	6 % b	4 % b	2 % b
2h	13 % a	4 % b	0 % b	0 % b
2hcr	3 % a	0 % b	2 % ab	2 % ab

110 DÍAS

Estadío	TRATAMIENTO			
	MS 50	KC 50	KC 100	MS 100
Pcf	23 % a	41 % a	29 % a	47 % a
ct	28 % a	8 % b	47 % a	8 % b
Brm	5 % b	22 % a	5 % b	19 % a
Ph	11 % a	7 % b	8 % b	11 % a
1h	8 % a	7 % a	5 % a	9 % a
2h	11 % a	13 % a	3 % b	2 % b
2hcr	14 % a	2 % b	3 % b	4 % b

148 DÍAS

Estadío	TRATAMIENTO			
	MS 50	KC 50	KC 100	MS 100
Pcf	18 % b	32 % b	25 % a	10 % c
ct	20 % b	16 % b	55 % a	13 % b
Brm	10 % a	0 % b	0 % b	0 % b
Ph	3 % a	16 % a	7 % a	6 % a
1h	3 % a	8 % a	3 % a	7 % a
2h	5 % b	16 % a	5 % b	29 % a
2hcr	42 % a	12 % b	5 % b	35 % a

200 DÍAS

Estadío	TRATAMIENTO			
	MS 50	KC 50	KC 100	MS 100
Pcf	3 % b	0 % b	10 % a	0 % b
ct	18 % b	36 % b	59 % a	7 % b
Brm	21 % b	39 % a	14 % b	29 % b
Ph	3 % a	3 % a	2 % a	0 % a
1h	3 % a	3 % a	2 % a	0 % a
2h	0 % b	5 % a	5 % a	0 % b
2hcr	52 % a	14 % b	8 % b	64 % a

260 DÍAS

Estadío	TRATAMIENTO			
	MS 50	KC 50	KC 100	MS 100
Pcf	0 % a	2 % a	0 % a	0 % a
ct	14 % b	62 % a	60 % a	13 % b
Brm	26 % a	23 % a	29 % a	25 % a
Ph	0 % a	2 % a	0 % a	2 % a
1 ó 2h	0 % b	4 % b	0 % b	24 % a
2hcr	60 % a	7 % b	11 % b	36 % a