

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

PROPAGACION "in vitro" DE LA ORQUIDEA

Laelia anceps var. alba.

T E S I S P R O F E S I O N A L

B i o l o g o

BARBARA SUSANA LUNA ROSALES.

1982.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

C O N T E N I D O

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	7
a. Descripción y clasificación botánica .	7
b. Origen y distribución	13
c. Métodos de cultivo tradicional	15
d. Cultivo de tejidos de orquídea	17
MATERIALES Y METODOS	22
a. Medios nutritivos	26
b. Proliferación del callo	28
c. Inducción a la diferenciación	32
d. Enraizamiento	34
e. Condiciones de cultivo	34
f. Adaptación de las plántulas al medio ambiente	34
g. Análisis estadístico de datos	34
RESULTADOS Y DISCUSION	39
a. Proliferación del callo	42
b. Inducción a la diferenciación	72
c. Enraizamiento	87
d. Adaptación	94
CONCLUSIONES	100
RECOMENDACIONES	103
BIBLIOGRAFIA	104

RESUMEN

Las causas principales que ocasionan la pérdida y desaparición de gran número de plántulas de orquídeas en México, están relacionados con problemas sociales, políticos y económicos más que biológicos.

La orquídea Laelia anceps var. alba es una de las variedades naturales de esta especie que está en peligro de desaparecer, por lo que en este trabajo se realizó su propagación aplicando la técnica de cultivo de tejidos a partir de tejido indiferenciado o callo obtenido de plántulas germinadas "in vitro". Principiando con la determinación de un medio nutritivo y los balances hormonales, de auxinas y citocininas, para lograr primeramente la proliferación y mantenimiento del callo y posteriormente la obtención de plántulas completas mediante la inducción a la organogénesis de este tejido.

El mejor medio nutritivo fue el Linsmaier y Skoog, ya que en la mayoría de los tratamientos con un balance hormonal mayor de auxina que de citocinina, se obtuvo una mayor cantidad de callo; este tejido suplementado con 0.5 mg/l de N-6-Bencil adenina (BA) indujo la formación de plántulas, las que posteriormente formaron raíces con 2 mg/l de ácido indolbutírico (IBA) y 0.5 mg/l de ácido naftalen-acético (ANA).

La formación de plántulas completas se obtuvo en un período de 10 meses aproximadamente, logrando finalmente su adaptación al medio ambiente en una mezcla de maquique y agrolita como sustrato.

INTRODUCCION

Las orquídeas se han convertido en plantas ornamentales muy populares desde hace ya mucho tiempo, debido a sus atributos estéticos expresados en flores de caprichosas formas, vistosos colores y atractivos aromas, despertando por ésto cada vez más el interés del hombre por ellas (37).

Sus relaciones biológicas son muy interesantes, como son sus mecanismos de polinización; sus asociaciones simbióticas con hongos para la germinación; así como sus características cosmopolitas por ser habitantes de ríos, pantanos, selvas, bosques y desiertos (17).

Las orquídeas en México desde el punto de vista ornamental han sido y siguen siendo objeto de un gran comercio entre aficionados y floristas que se dedican a la propagación del material que proporcionan los bosques y selvas de nuestro país (19).

La gran riqueza de México, con respecto al número de especies de orquídeas que posee, es quizá insospechada y menospreciada por la mayoría de los orquidófilos (55).

Esta gran riqueza se debe principalmente a la amplia variación en su relieve geográfico, el cual presenta las condiciones de altura, temperatura y humedad ideales (16) que propician la proliferación de las diferentes especies de orquídeas en muchas áreas de nuestro país, colocando principalmente a los estados de Veracruz, Chiapas, Oaxaca y Guerrero a la cabeza en esta producción (55) (Figura 1).

La mayoría de las orquídeas, ecológicamente no son exitó

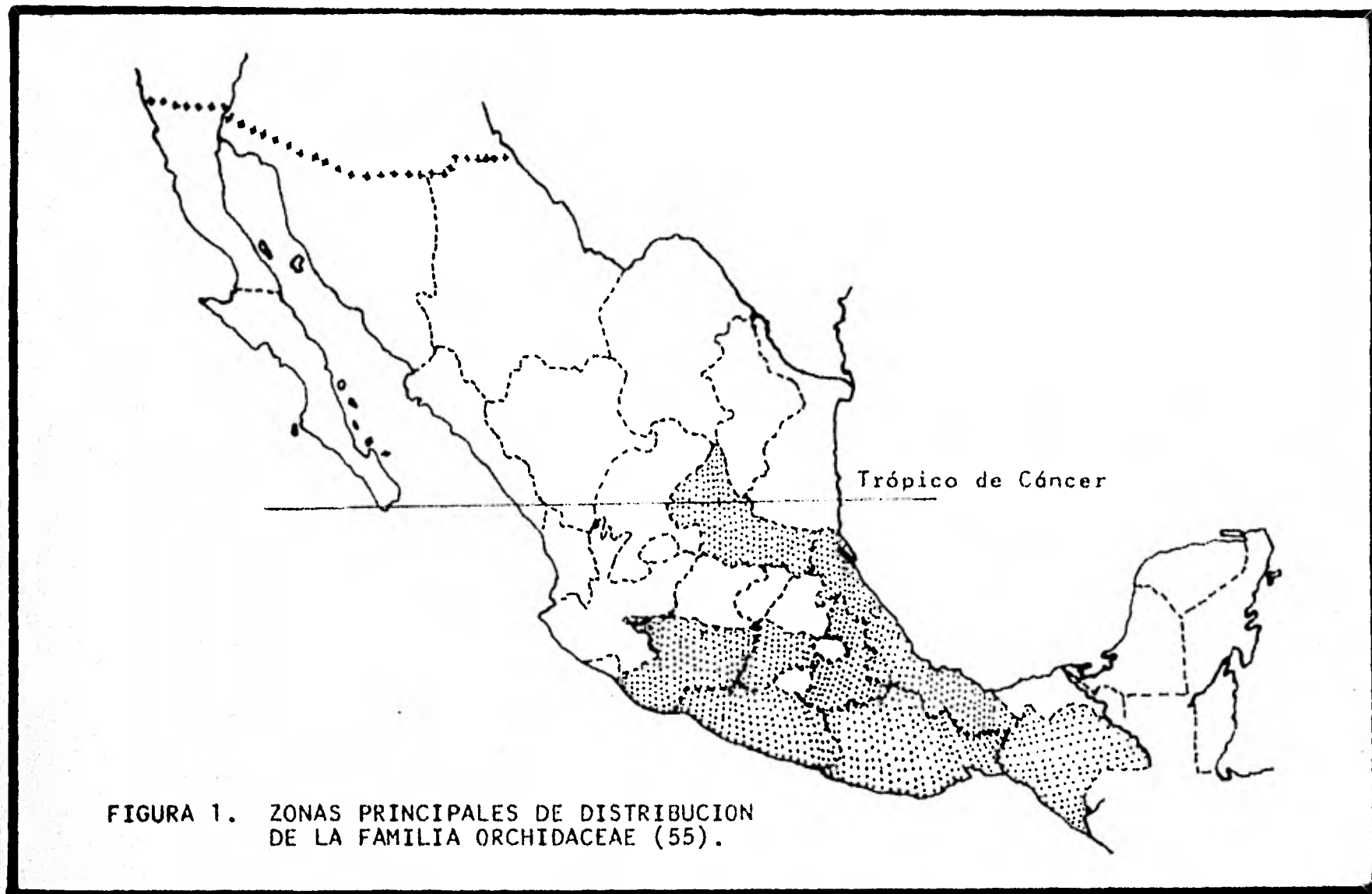


FIGURA 1. ZONAS PRINCIPALES DE DISTRIBUCION DE LA FAMILIA ORCHIDACEAE (55).

sas, ya que no forman grandes colonias como lo hacen otras plantas; tienden a ser locales, ya que frecuentemente están restringidas a pequeñas áreas y aún en éstas es difícil localizarlos (37).

Su existencia está sujeta a condiciones muy específicas, como son el tipo de sustrato, acidéz del mismo, humedad, luz, precipitación, temperatura, etc., además de los intrincados mecanismos de polinización y la necesidad que tienen de asociarse con hongos simbioses para su germinación (37).

Se ha llegado a la conclusión de que únicamente el 20% de los ejemplares de orquídeas, adquiridas o colectadas por a aficionados, sobreviven el primer año fuera de su habitat y por desgracia la afición por el cultivo de orquídeas no siempre está acompañada de una verdadera conciencia, sino que en la mayoría de los casos es un pasatiempo temporal (19).

Desafortunadamente las causas principales que están propiciando la desaparición de orquídeas y otros vegetales valiosos están relacionadas con problemas sociales, políticos y económicos más que biológicos; como por ejemplo, está el caso del indígena, que desprovisto de suficientes fuentes de trabajo e ingresos fijos aprovecha los recursos silvestres, como son las orquídeas, que le proporciona el bosque o selva, para venderlas en gran escala a los compradores aficionados quienes pagan sumas muy bajas por ejemplares que quizá no lleguen a sobrevivir (19).

Además de estas colectas en gran escala, están también la industrialización de maderas tropicales y subtropicales;

el desmonte para fines agrícolas y ganaderos; y la creciente urbanización, produciendo un desequilibrio ecológico que provoca la desaparición de muchas especies de la familia Orchidaceae, originarias de nuestro país (19).

La propagación comercial de orquídeas en México, en general, sigue efectuándose por el método tradicional, como es por división del rizoma o por hijuelos, proporcionando una baja producción de plantas, en cambio en países como los Estados Unidos y otros de Europa y Asia se aplica, además, el método de cultivo de tejidos "in vitro" para la propagación y multiplicación de estas plantas.

Esta técnica de cultivo de tejidos permite el desarrollo de plantas completas en un medio artificial, bajo condiciones asépticas, a partir de porciones vegetales muy pequeñas, tales como embriones, semillas, tallos, raíces, meristemos, callo, células individuales, granos de polen, etc. (20); aportando al mismo tiempo múltiples ventajas y aplicaciones como son la obtención masiva de ejemplares incrementando "n" veces el número de plantas propagadas, además de poder obtenerlas libres de patógenos (8).

Debido a la gran amenaza que continuamente sufren las orquídeas originarias de nuestro país, se está provocando la desaparición de muchas especies valiosas, además de que las técnicas tradicionales empleadas para su propagación por los arquidófilos son lentas y no proporcionan gran cantidad de dichas plantas. Por estos motivos y por las cualidades de método de propagación "in vitro" se planeó la elaboración del pre

sente trabajo, aplicando la técnica de cultivo de tejidos con la orquídea Laelia anceps var. alba, la cual está en peligro de extinción.

Este bello ejemplar es una variedad natural, originaria del estado de Veracruz y es apreciada principalmente por la forma de su flor y el color blanco que la caracteriza. Actualmente es sumamente difícil encontrarla en su habitat.

Empleando los métodos de propagación tradicional se obtienen a largo plazo pocas plantas, por lo cual es conveniente establecer y adaptar la técnica de cultivo de tejidos para la obtención a corto plazo de gran cantidad de ejemplares de esta orquídea y contribuir de esta manera a evitar su extinción. Surgiendo así, como objetivos, el determinar un medio nutritivo y los balances hormonales para lograr en primer lugar el mantenimiento y proliferación del tejido indiferenciado o callo y posteriormente la obtención de plantas completas mediante la inducción a la organogénesis de este tejido; y una vez establecida esta última parte, lograr su adaptación a las condiciones ambientales.

ANTECEDENTES

a. Descripción y clasificación botánica

Las orquídeas son una de las más grandes y diversas familias de plantas, comprende 800 géneros y cerca de 30,000 especies (4, 37, 40, 47).

Las orquídeas en general son plantas herbáceas y perennes que carecen de tejido leñoso (11, 37, 47), pueden ser epífitas, terrestres, litofíticas, palustres y subterráneas. Vistas como un grupo presentan una tremenda variabilidad morfológica.

Las plantas de orquídeo varían en tamaño desde unos cuantos milímetros a varios metros (4) y se pueden dividir según tengan o no tallo, en caulescentes y acaulescentes respectivamente.

Dependiendo del tipo de crecimiento del tallo pueden ser monopodiales, que tienen el eje o tolla principal con crecimiento indefinido y está provisto en toda su longitud de raíces adventicias; y simpodiales, que tienen tallo o pseudobulbo de crecimiento definido y que comunmente están unidos por el rizoma (11).

En las orquídeas terrestres las raíces son alargadas y ramificadas, cubiertas de pelillos absorbentes o radicales; en las epífitas las raíces son más especializadas, muchos pelillos radicales se han sustituido por una funda de células muertas y esponjosas llamada velamen, la cual facilita la absorción de agua y minerales; estas raíces pueden originarse

de cualquier punto del tallo y crecer en todas direcciones, abrazando troncos y ramas para afianzar a la planta (37). Las flores de orquídea son tan variables como las plantas que las producen, miden desde un milímetro de diámetro hasta 25.5 cm (4, 37). También existe gran diversidad en su color, son muy vistosas y sumamente especializadas; además sus estructuras florales son muy peculiares.

El cáliz, está compuesto por tres sépalos; la corola está constituida por tres pétalos internos, dos de ellos son la terales y simétricos y de menor tamaño que el tercero posterior, éste tiene forma variable y es llamado labela. El androceo y gineceo están fusionados en un solo cuerpo llamado columna, que a veces se prolonga en su parte superior en un apéndice carnoso llamado rostelo (11) (Figura 2).

El polen está contenido dentro de pequeños paquetes llamados polinios, estos son más o menos globosos colocados en una depresión llamada el clinandrio, debajo de la cofia de las anteras; el número de polinios por flor varía en los diferentes géneros.

Los frutos de las orquídeas son las cápsulas tricarpelares que se desarrollan a partir del ovario inmediatamente después de efectuada la polinización y fertilización. Las semillas de orquídeas son las más pequeñas que se conocen, pudiendo producir entre 500 mil y un millón de ellas por cápsula (37, 47). Estas semillas consisten principalmente de un embrión indiferenciada, casi sin contener reservas alimenticias (4, 49), estando cubiertas por una membrana delgada llamada

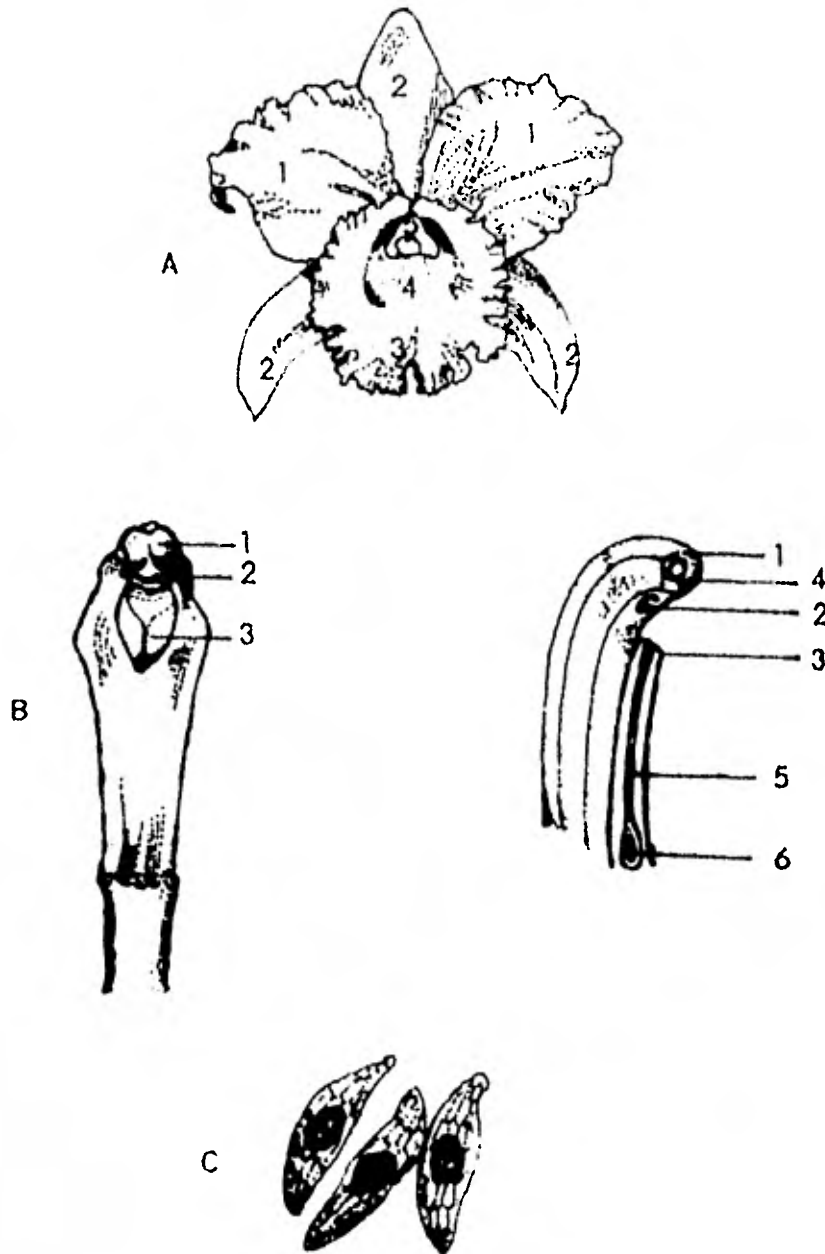


FIGURA 2. A. ESTRUCTURA TIPICA DE UNA FLOR DE ORQUIDEA: 1. Pétalos; 2. Sépalos; 3. Labelo; 4. Garganta; 5. Columna.
 B. ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS DE UNA FLOR DE ORQUIDEA: 1. Antera; 2. Rostelo; 3. Estigma; 4. Polinios; 5. Canal del estilo; 6. Ovario.
 C. SEMILLAS TIPICAS DE ORQUIDEA. (11, 47).

testa (37).

El género Laelia contiene más de 75 especies, siendo la mayoría epífitas o litófilas (11, 21). Los pseudobulbos generalmente son alargados, carnosos y algo comprimidos, con una o dos hojas siempre verdes (Figura 3).

Los sépalos son de igual forma entre sí, mientras que los pétalos son más grandes que aquellos. El labelo con lóbulos laterales que envuelven la columna y la parte central plana, bifida o aguda, con el mismo aspecto que el género Cattleya.

La especie L. anceps Lindl. es una notable orquídea que se distingue fácilmente por sus pseudobulbos ovoides, tienen además los bordes afilados y numerosas costillas laterales; pero sobre todo dos de ellas más salientes que las demás y que le dan a los pseudobulbos una forma más o menos cuadrangular; su longitud es a lo más de 25 cm, son de color verde amarillento, terminando en su parte superior por dos hojas de forma lanceolada y de color verde pálido. El tallo florífero es delgado y su longitud varía de 30 a 40 cm (48); posee inflorescencias en forma de racimos, en número de cuatro a seis, muy atractivas y hasta de 12 cm de diámetro (18, 55). Sus colores son extremadamente variables, se han descrito hasta 26 variedades naturales (11, 55), dentro de los cuales incluye a la variedad alba, muy hermosa, en la que los pétalos y sépalos son anchos y totalmente blancos; el labelo es también de un blanco puro presentando un pequeño disco amarillo muy pálido en la parte más profunda de la garganta (Figura 4). Su é-



FIGURA 3. PLANTA TIPICA DEL GENERO Loelia.



FIGURA 4. FLOR TIPICA DE LA ORQUIDEA Laelia anceps
var. alba.

poca de floración es de octubre a enero (18, 39) (Figura 4).

Su clasificación taxonómica (5, 37, 44, 45) es como sigue:

Reino	Vegetal
División	Embryophyta
Subdivisión	Angiospermae
Clase	Monocotyledoneae
Orden	Orchidales
Familia	Orchidaceae
Subfamilia	Epidendroideae
Tribu	Kerosphaeroideae
Serie	Acranthae
Género	<u>Laelia</u>
Especie	<u>anceps</u> Lindl.
Variedad	<u>alba</u>

b. Origen y distribución

Las orquídeas se mencionan ya en escritos chinos que datan de varios siglos a. de C., el primero en estudiarlas con un criterio científico fue el filósofo y naturalista Teofrasto (374-287 a. de C.) (11), quien por primera vez las llamó "orquídeas", la cual se deriva de la palabra griega "orchis" que significa testículo (25).

Muchas centurias después, Carlos de Linneo (1707-1778), gran naturalista sueco, fundador del sistema en que se basa la clasificación y nomenclatura científica, también se intere

só por las orquídeas. Como también en el Siglo XIX lo hicieron Humboldt, Darwin y especialmente el profesor de la Universidad de Londres, John Lindley, quien contribuyó grandemente al conocimiento de las orquídeas con su libro titulado "Géneros y especies de las plantas orquidáceas", que publicó en 1840.

También permitieron a los europeos admirar la belleza de las orquídeas, las expediciones que a México, Brasil, Colombia y Venezuela realizó Jean Linden de 1835 a 1845 (11).

En México, mucho antes de que los españoles llegaran y antes de Linneo, gran número de orquídeas habían sido ya cultivadas en los palacios y residencias de los príncipes aztecas en Tenochtitlán.

Los aztecas apreciaban y cultivaban algunas especies, como la vainilla que era utilizada como una forma de tributo, así como también la empleaban para aromatizar sus bebidas. Tal vez sus predecesores los toltecas hicieron lo mismo. Se ignora si estos pueblos fueron los primeros que cultivaron las orquídeas o si tal mérito corresponde a los chinos (17, 55).

Las orquídeas viven prácticamente en los cinco continentes, entre los 68° de latitud N y los 56° de latitud S (11) y alturas de mil hasta cuatro mil m.s.n.m. (11, 37, 55).

Los países tropicales e intertropicales cuentan con cientos de géneros de orquídeas que en su mayoría son epífitas. Al alejarse del trópico, menos plantas de este tipo se encuen

tran; en cambio, abundan las terrestres que prefieren, en su gran mayoría, las zonas templadas-frescas o frías (18).

El género Laelia se encuentra distribuido en toda América Tropical, desde México hasta Brasil. En México la especie L. anceps Lindl. es nativa de los estados de Guerrero, Hidalgo, Oaxaca, San Luis Potosí, Veracruz y probablemente en otras regiones más (54, 55), siendo la variedad alba originaria del estado de Veracruz.

c. Métodos de cultivo tradicional

El cultivo de orquídeas no es nuevo. Confucio (551-479 a. de C.) mencionaba las orquídeas en sus escritos, indicando que los chinos usaban las flores para decorar sus casas.

La evolución del cultivo de orquídeas como un pasatiempo hasta la producción comercial fue muy lenta. Los antiguos griegos y los romanos, como los mexicanos utilizaban más las orquídeas por sus cualidades medicinales que por las estéticas.

No fue sino hasta el Siglo XVIII que el interés estético de las orquídeas realmente empezó a desarrollarse. En occidente cuando las primeras plantas tropicales fueron importadas a Europa, cientos de miles de plantas perecieron en el tránsito de los trópicos americanos y muchos miles más fenecieron en los invernaderos ingleses y los del resto del continente, por ignorancia de los colectores. Los jardineros exitosos guardaron celosamente sus procedimientos secretos, de

como cultivar aquellas orquídeas extrañas y llevarlas hasta la floración. Las dificultades de aquellos primeros intentos de cultivo se debieron principalmente a la idea errónea de que las orquídeas sólo crecían en la oscuridad húmeda y opresivamente cálida de las junglas tropicales con lo cual las orquídeas obtuvieron la reputación de ser "frágiles parásitas" y de ser en extremo delicadas (37).

En 1821, Conrad Loddiges, empezó a cultivar plantas de orquídeas comercialmente cerca de Londres, lugar donde nació la industria de orquídeas (47).

En 1939 se constituyó, por primera vez en México, la sociedad denominada "Sociedad de Amigos de las Orquídeas" con el objeto de fomentar su cultivo (29).

Las orquídeas, como la mayoría de los cultivos florícolas pueden propagarse por semillas o bien vegetativamente.

La propagación por semillas tiene la ventaja de producir recombinaciones de genes los cuales originan nuevas formas (5). En su habitat, la germinación se lleva a cabo cuando algún hongo simbiote, como Rhizoctonia o Phytophthora está presente, el cual le suministra azúcares a la semilla (4).

En 1903 científicos como Bernard, en el Jardín Botánico de París, trataron de germinar semillas de orquídeas. El y Burgeff, independientemente concluyeron que el hongo era necesario para germinar las semillas en el laboratorio. No fue sino hasta principios de 1920, cuando Knudson demostró que el hongo convertía almidones en azúcares y las semillas utilizaban el azúcar para germinar (4, 47). Ahora las semillas de

orquídea, fácilmente pueden germinar y crecer pero requieren de un cuidado especial (47).

El proceso de reproducción asexual tiene importancia especial en horticultura porque la composición genética de la mayoría de los cultivares y plantas ornamentales más valiosas, es altamente heterocigótica y las características que distinguen a esos tipos se pierden de inmediato al propagarlos por semilla (20).

Los géneros de orquídeas simpodiales de mayor importancia comercial, tales como Laelia, Cattleya, Miltonia y Odontoglossum pueden propagarse vegetativamente por división del rizoma durante la época en que se encuentra latente o justo cuando comienza el nuevo crecimiento, esta división se realiza en plantas que tienen seis o más pseudobulbos. El rizoma se corta entre el tercer y cuarto pseudobulbo y ambas secciones se plantan como plantas individuales (10, 20).

Las orquídeas monopódicas como Dendrobium y Epidendrum a veces producen hijuelos que forman raíces y una vez que se han formado cuatro o más raíces entonces este brote puede separarse de la planta madre y plantarse (10, 20, 47).

Estas técnicas tradicionales de propagación clonal de orquídeas en general son tardadas ya que solo producen unas cuantas plantas de un clon por año (46).

d. Cultivo de tejidos de orquídea

La técnica de cultivo de tejidos ha revolucionado el mundo de las orquídeas. Probablemente comenzó o principios de

1920 cuando Bernard, Burgeff y Knudson independientemente encontraron métodos para cultivar orquídeas en grandes cantidades mediante la germinación de semillas sobre agar (4, 9).

Los métodos que a la fecha están asociados con el concepto del cultivo de tejidos han sido de considerable importancia para la propagación de orquídeas durante casi tres cuartos de siglo. Es posible que las orquídeas hayan sido las primeras plantas hortícolas propagadas por cultivo de tejidos o por lo menos mediante métodos asépticos "in vitro".

La propagación de orquídeas revolucionó en los años de 1921 y 1922 con el trabajo del profesor Knudson (4) quien descubrió que las semillas podían germinar asimbióticamente en un medio aséptico con sacarosa. Después de continuos debates, la validez de la germinación asimbiótica de las orquídeas como un método práctico y experimental comenzó a establecerse formalmente. El medio original fue mejorado 25 años después de haber sido publicado.

En esta misma época los primeros meristemas fueron cultivados "in vitro" (5). Pero no fue sino 15 años después, en 1960, cuando este método de cultivo de tejidos empezó a aplicarse para propagar orquídeas (53).

La potencialidad de multiplicación por este método fue observado por el Dr. Morel, al recobrar *Cymbidiums* libres de virus "in vitro", a partir de plantas infectadas (5, 10, 32, 34, 42, 46, 51, 53), al mismo tiempo formuló la idea de usar esta técnica para la multiplicación clonal masiva de orquídeas en un período corto; Morel observó que al utilizar los

meristemas apicales y cultivarlos "in vitro", formaban cuerpos parecidos a protocormos. Estos cuerpos posteriormente produjeron brotes y raíces como sucede en una plántula proveniente de semilla. Por otra parte si ese cuerpo parecido a un protocormo se seccionaba y transfería a un medio de cultivo nuevo se formaban cuerpos adicionales, los cuales originaron también plántulas completas.

En 1964, Morel obtuvo flores de Cymbidium y Miltonia de las plántulas que habían sido propagadas por cultivo de meristemas hacia cinco o seis años (31). En reportes de 1965 menciona que al utilizar explantes de Cattleya, Odontoglossum, Lycaste, Dendrobium, Miltonia y Phaius, también se originaron cuerpos como protocormos; él mismo sugiere el uso de ácido 3-indol-acético (AIA) o ácido naftalen-acético (ANA) como suplemento del medio nutritivo en una concentración de 1 ppm y además el uso de agua de coco y jugo de piña en el medio (46).

Wimber, en 1965, obtuvo tejido indiferenciado a partir de hojas de plántulas de Cymbidium (46). Champagnat y Morel dos años después, utilizaron hojas enteras de Cattleya de 10 a 15 mm de largo y las sembraron en el medio mineral de Murashige y Skoog (empleado para el cultivo de callos de tabaco) con sacarosa, AIA y kinetina, después de dos semanas en cultivo se formó callo en la superficie del corte, el cual poco a poco se diferenció en brotes foliares o protocormos (33). Ellos mismos, en compañía de Mounetau, en 1970 reportaron el uso de ápices de brote y bases de hoja para inducir callo y a partir de éste, plántulas completas; así también Ball, Ardit-

ti y Churchill (5, 15, 38) utilizaron ápices de hoja de Dendrobium, Epidendrum y Laeliocottleya con el mismo fin. Además en 1972, realizaron el cultivo de ápices de raíz de Epidendrum, empleando el medio de Ojima y Fujiwara (5, 15, 38), estos ápices se elongaron, adelgazaron y perdieron su clorofila sin lograr obtener formación de callo o plántulas.

Champagnat y Marel en el mismo año intentaron desarrollar los ápices de muchos híbridos de Phaenopedilum, estos ápices fueron cultivados en el medio Thomala, desarrollándose perfectamente y produciendo nuevas hojas y dando origen rápidamente a plántulas. Para inducir la formación de callo, agregaron al medio 1 ppm de ácido 2-4-diclorofenoxi-acético (2-4-D) donde algunos de los explantes formaron callo y protocormos. El tejido indiferenciado fue subcultivado en medio fresco varias veces, formándose plántulas completas al eliminarse esta hormona (33).

Kim, Kunisaki y Sogawa (38) cultivaron yemas de bulbos de Dendrobium, en medio líquida suplementado con 15% de agua de coco, donde se formaron cuerpos parecidos o protocormos y posteriormente plántulas.

En 1971, Steward y Mapes (38), aplicaron el cultivo de células en suspensión para la obtención de plántulas; para esto cultivaron ápices de brates en medio gelificado suplementado con agua de coco y ANA, estos ápices originaron callo el cual fue transferido a medio líquida de la misma composición, sin embargo la producción de las células en suspensión fue mejor cuando el ANA se reemplaza por 2-4-D. Estas células ori-

ginaron protocormos al sembrarlas en el medio sólido, los que se transformaron después de nueve meses en plántulas completos.

En 1973, Intuwong y Sagawa (33, 38), lograron propagar las orquídeas Ascofinetia, Neostylis, Vascostylis y otras por medio del cultivo de inflorescencias muy jóvenes, menores de 1.5 cm de longitud, las cuales se cultivaron en el medio mineral de Vacin y Went (33, 38) suplementado con agua de coco y observaron que en la copa epidérmica del raquis se formó un grupo de células meristemáticas que se desarrollaron posteriormente en cuerpos parecidos a protocormos, los cuales dieron origen a plántulos.

Como se ha visto, las aplicaciones del cultivo de orquídeas "in vitro" son muy variadas, así como los posibles rutas a seguir.

Así como se pueden obtener plantas libres de virus o de otro patógeno por medio del cultivo de meristemas, también se pueden obtener por medio del cultivo de callo o de células en suspensión, variaciones genéticas que nos pueden dar nuevas variedades. También se puede asegurar una clonación perfectamente definido y una propagación a gran escala de plántulos; además de otros beneficios hortícolas inherentes (5).

El establecimiento del cultivo "in vitro" principia con la elección del tejido, el cual debe obtenerse directamente de la planta donadora previamente seleccionado (1, 36, 56). En este caso se empleó callo; el cual es un tejido simple, compuesto por una masa de células indiferenciadas de tipo parenquimatoso (7), derivado de plántulas provenientes de semilla de L. anceps var. albo (Figura 5), germinadas osimbióticamente bajo condiciones asépticas, asegurándose así lo aséptico del tejido (13).

La composición del medio nutritivo fue un factor determinante para el establecimiento exitoso del cultivo (1, 5, 36, 56), por lo cual se probaron tres medios nutritivos diferentes (Cuadro 1), los cuales diferían entre sí en el tipo y/o concentración de las sales inorgánicas (macro y micronutrientes), así como también en los constituyentes orgánicos como aminoácidos, vitaminas e inositolés, exceptuando la fuente de carbono y energía que fue la sacarosa en todos los medios.

Los reguladores del crecimiento vegetal que se añadieron al medio nutritivo fueron el ácido naftalen-acético (ANA) y el ácido 3-indol-butírico (IBA) como auxinas y la N-6-Bencil adenina (BA) como citocinina. Estas se utilizaron en diferentes concentraciones para así poder determinar las que produjeran el mejor resultado.

Los medios de cultivo fueron ajustados a un pH de 5.5 con la adición de una solución ácida (HCl 1.0 N) o básica (KOH 0.1 N); además se solidificó el medio con 7 g/l de agar-



FIGURA 5. CALLO DERIVADO DE PLANTULAS DE
Laelia anceps var. alba GERMINA
DAS in vitro.

CUADRO 1. COMPOSICION DE LOS 3 MEDIOS NUTRITIVOS.

SALES INORGANICAS	MEDIO 1 R & M (mg/l)	MEDIO 2 L & S (mg/l)	MEDIO 3 Z (mg/l)
<u>Macronutrientes</u>			
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	400.0	-	-
NH_4NO_3	-	1650.0	1650.0
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1000.0	-	-
KNO_3	-	1900.0	1900.0
KH_2PO_4	250.0	170.0	170.0
KCl	500.0	-	-
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	440.0	440.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	400.0	370.0	370.0
<u>Micronutrientes</u>			
H_3BO_3	0.03	6.2	6.2
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	0.025	0.025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.001	0.025	0.025
KI	-	0.83	0.83
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	7.5	22.3	22.3
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	0.25	0.25
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.03	9.0	8.6
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10.7	27.8	-
Na_2EDTA	22.4	37.3	-

CUADRO 1. ... CONTINUACION.

CONSTITUYENTES ORGANICOS	MEDIO 1 R & M (mg/l)	MEDIO 2 L & S (mg/l)	MEDIO 3 Z (mg/l)
<u>Inositoles</u>			
Myo-inositol	100.0	100.0	-
Meso-inositol	-	-	100.0
<u>Aminoácido</u>			
Glicina	2.0	-	2.0
<u>Vitaminas</u>			
Niacina	0.5	-	0.5
Piridoxina-HCl	0.5	-	0.5
Tiamina-HCl	0.1	0.4	0.1
Ac. Ascórbico	150.0	-	10.0
<u>Fuente de Carbono</u>			
Sacarosa	30.0 g	30.0 g	30.0 g

agar.

Los medios de cultivo una vez preparados, se vaciaron en frascos refractarios de 125 ml y se taparon, inmediatamente se esterilizaron en autoclave a una presión de 1.5 kg/cm^2 y a una temperatura de 120°C durante 15 minutos (6) (Figura 6).

a. Medios nutritivos

La selección del mejor medio de cultivo para el mantenimiento y proliferación del callo se llevó a cabo probando los medios nutritivos modificados (Cuadro 1) de Reinert y Mohr (M1), de Linsmaier y Skoog (M2) y el de Zuccherelli (M3) (5, 58).

El medio Reinert y Mohr se ha empleado para la propagación del género Cattleya a partir de yemas meristemáticas laterales, este género es muy afín al género Laelia por lo cual los requerimientos de estas orquídeas pueden ser similares entre sí (5). El medio Linsmaier y Skoog es muy similar al de Murashige y Skoog (35), excepto en el contenido de constituyentes orgánicos el cual incluye aparte del mioinositol y la tiamina, la piridoxina y la glicina; estos medios se han empleado para el cultivo de callo de tabaco y también para el mantenimiento del cultivo de callo derivado de ápices de hoja de Cattleya (5, 14). El medio Zuccherelli es también muy similar al de Linsmaier y Skoog, carece de un suplemento de hierro pero incluye los aminoácidos y vitaminas que posee el de Reinert y Mohr; se eligió porque en pruebas preliminares indu



FIGURA 6. ESTERILIZACION EN AUTOCLAVE DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

jo muy buenos resultados en Laelia a pesar de estar reportado para el durazno (58).

En cada uno de los medios de cultivo se probaron 24 tratamientos hormonales de ANA/BA (Cuadro 2) y determinar así el mejor tratamiento para la proliferación del callo.

Para lo inducción a la diferenciación se emplearon 12 tratamientos hormonales de BA/ANA (Cuadro 3) empleando solo el medio M2, ya que en éste se obtuvieron los mejores resultados para la etapa anterior.

Para lo fase de enraizamiento de las plántulas formadas, se continuó empleando el medio M2 probando 7 tratamientos hormonales de IBA/ANA (Cuadro 4).

b. Proliferación del callo

El callo originado de las plantulas germinadas en cultivo asimbiótico, se separó y se llevó a cabo la siembra de éste en los diferentes medios de cultivo. La siembra se realizó bajo condiciones de asepsia en una campana de flujo laminar empleando material quirúrgico estéril (Figura 7).

La cantidad de tejido inicial sembrado para la proliferación de callo, así como para la inducción a la organogénesis, fue lo más homogénea posible en todos los tratamientos (Figura 8).

Inicialmente se hicieron tres repeticiones para cada tratamiento en los diferentes medios, aumentándose posteriormente

CUADRO 2. TRATAMIENTOS HORMONALES PARA LA PROLIFERACION DEL CALLO.

ANA (mg/l) \ BA (mg/l)	0.0	0.1	0.2	0.8	1.6	2.0
0.0	*1	2	3	4	5	6
0.1	7	8	9	10	11	12
0.5	13	14	15	16	17	18
1.0	19	20	21	22	23	24

CUADRO 3. TRATAMIENTOS HORMONALES PARA LA INDUCCION A LA DIFERENCIACION.

ANA (mg/l) \ BA (mg/l)	0.0	0.5	1.0	2.0
0.0	*1	2	3	4
0.1	5	6	7	8
0.5	9	10	11	12

*Número de tratamiento.

CUADRO 4. TRATAMIENTOS HORMONALES PARA LA FASE DE ENRAIZAMIENTO

TRATAMIENTOS	HORMONAS (mg/l)	
	IBA	ANA
1	0.0	0.0
2	0.0	1.0
3	0.0	2.0
4	0.5	0.5
5	1.0	0.0
6	1.0	1.0
7	2.0	0.5

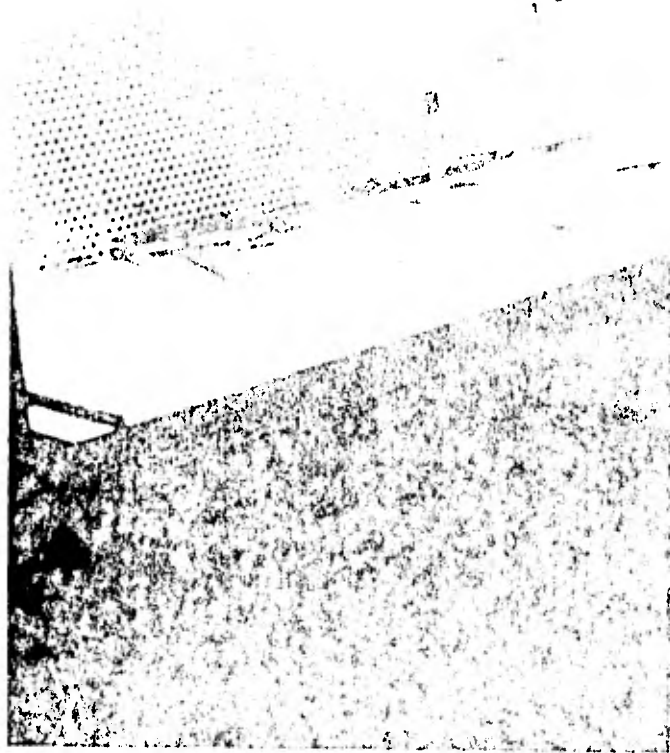


FIGURA 7. CAMPANA DE FLUJO LAMINAR Y MATERIAL QUIRURGICO ESTERIL.

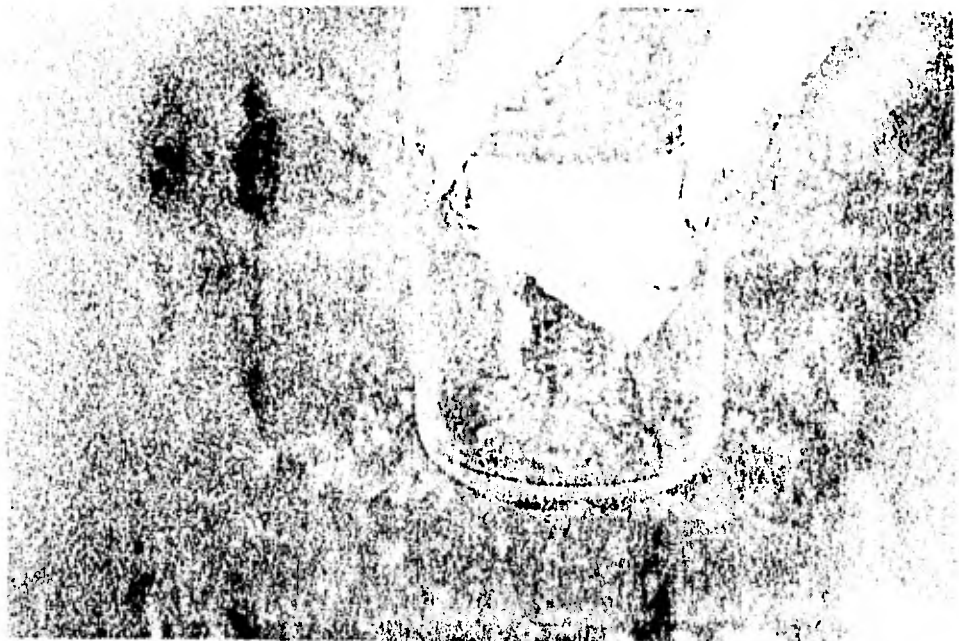


FIGURA 8. CALLO INICIAL SEMBRADO PARA SU PROLIFERACION Y DIFERENCIACION.

estas repeticiones en los medios M2 y M3.

Para poder lograr la proliferación constante de callo, se realizaron transferencias del tejido a medio nutritivo fresco cada 21 días, ya que el constante crecimiento del callo provocó el agotamiento de los nutrientes y la acumulación de desechos metabólicos del tejido, los cuales llegaron a ser tóxicos (46).

El tejido indiferenciado fue fragmentado en cada resiembra, eliminándose las zonas ennegrecidas del tejido, ya que éstas, debido a los desechos metabólicos que producían, podían disminuir la viabilidad del resto del tejido (46).

c. Inducción a la diferenciación

Esta inducción se hizo utilizando el callo de la fase anterior, éste se sembró sin fragmentarlo en el medio de inducción y fue transferido a medio fresco cada 30 días. La primera siembra se hizo con seis repeticiones por tratamiento, en tres de ellos se sembró callo clorofílico de los medios M2 y M3, mientras que en el resto de los frascos se sembró tejido clorótico proveniente del medio M1, el cual tomó esta coloración en la tercera resiembra después de días en cultivo. Esto se hizo con la finalidad de poder observar la potencialidad de diferenciación de los 2 tipos de tejido obtenido (Figura 9).

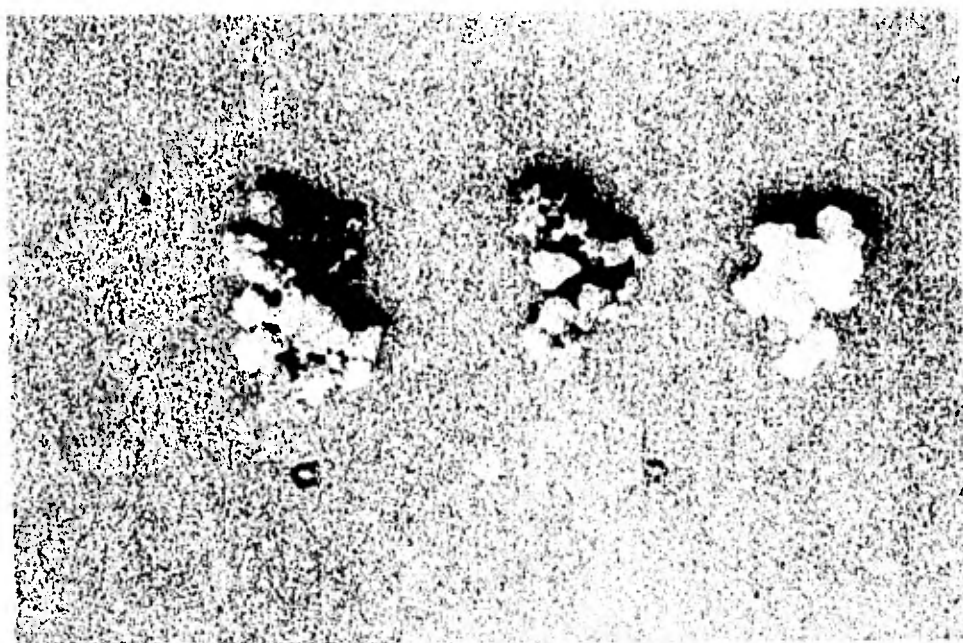


FIGURA 9. TIPOS DE TEJIDOS EMPLEADOS PARA LA INDUCCION A LA DIFERENCIACION:
a. CLOROFILICO ; b. CLOROTICO.

d. Enraizamiento

Una vez que se formaron brotes foliares de aproximadamente uno a dos centímetros se pasaron al medio de enraizamiento, donde a los 15 días en cultivo se observaron las primeras raíces, trasplantándose a medio fresco cada 21 días.

e. Condiciones de cultivo

Todos los cultivos fueron colocados en una cámara de incubación en donde se mantuvieron a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con fotoperiodo de 16 horas luz y ocho de oscuridad, bajo una intensidad luminosa de 2,000 a 2,500 lux proporcionada por cuatro focos Gro-Lux de 40 watts (5, 6) (Figura 10).

f. Adaptación de las plántulas al medio ambiente

Cuando las plántulas estuvieron formadas completamente, es decir, con más de tres raíces de uno a dos centímetros de longitud se trasplantaron a seis diferentes sustratos los cuales fueron esterilizados previamente (Cuadro 5).

g. Análisis estadístico de datos

Proliferación de callo.

Para comparar el peso fresco (56) del callo en la siembra inicial y primera resiembra, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) (30) utilizando un modelo con arreglo factorial de tratamientos, seis concentraciones de ANA, cuatro de

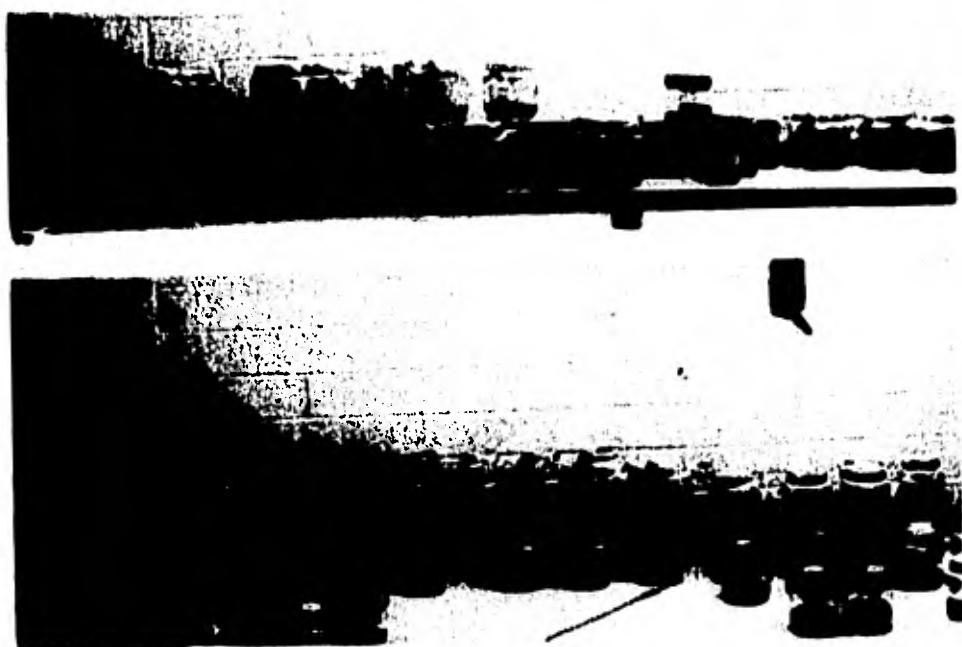


FIGURA 10. CAMARA DE CULTIVO CON TEMPERATURA, FOTOPERIODO E INTENSIDAD LUMINOSA CONTROLADA.

CUADRO 5. SUSTRATOS EMPLEADOS PARA LA ADAPTACION DE LAS PLANTULAS AL MEDIO AMBIENTE.

SUSTRATOS	PROPORCION	SIMBOLOGIA
Agrolito		A
Maquique		M
Turba		T
Agrolito y Turba	1 : 1	A + T
Maquique y Turba	1 : 1	M + T
Agrolito y Maquique	1 : 1	A + M

BA y tres medios ($ANA_6 \times BA_4 \times M_3$), con un diseño experimental completamente al azar.

Posteriormente se realizó el ANOVA utilizando un modelo con arreglo factorial de tratamientos ($ANA_6 \times BA_4$) y con un diseño experimental completamente al azar en los resultados de cada uno de los medios en cada resiembra, exceptuando los de la segunda y tercer resiembra en el medio M2 y los de la tercer resiembra en el medio M3.

Para estudiar las diferencias entre el efecto de cada hormona y el efecto de la interacción, se analizaron utilizando el método de comparaciones múltiples de Tukey (12) determinándose de este modo las mejores concentraciones para la proliferación del callo. En aquellas resiembras donde no se aplicó el ANOVA anteriormente mencionado, se hizo una comparación considerando los pesos totales en los tres medios considerando el modelo completamente al azar. Los resultados se presentan en las tablas 1, 2 y 3.

Inducción a la diferenciación.

Se realizó el ANOVA utilizando un modelo con un arreglo factorial de tratamientos ($BA_4 \times ANA_3$) y con un diseño experimental completamente al azar en cada una de las siguientes variables: número y peso en gramos de las plántulas bien desarrolladas de 1 a 2 cm de altura y dos o más hojas con forma típica; mientras que para el callo, protocormos y plántulas no bien desarrolladas (no cumplían con las características de las bien desarrolladas) se tomó únicamente el peso. Realizán

do posteriormente las comparaciones múltiples por el método de Tukey y determinar así la mejor concentración hormonal para la inducción a la diferenciación.

Enraizamiento.

Se analizó el porcentaje de plántulas enraizadas para cada tratamiento así mismo el número promedio de raíces por plántula, considerando el intervalo de valores de cada uno de los tratamientos con promedio más alto, estableciendo su intervalo de confianza.

Adaptación.

Se comparó el porcentaje de adaptación de las plántulas en cada uno de los sustratos empleados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TABLA 1. PESOS TOTALES Y PROMEDIOS EN GRAMOS DEL CALLO AL INICIO Y EN CADA RESIEMBRA EN EL MEDIO REINERT Y MOHR (Ml).

*TRATAMIENTOS	SIEMBRA INICIAL		1a. RESIEMBRA		2a. RESIEMBRA		3a. RESIEMBRA	
	Peso Total	Peso Prom.	Peso Total	Peso Prom.	Peso Total	Peso Prom.	Peso Total	Peso Prom.
1	2.51	0.83	3.3	1.1	4.0	1.3	6.3	2.1
2	2.45	0.81	4.19	1.39	7.05	2.35	11.9	3.96
3	1.78	0.59	2.55	0.85	2.45	0.81	3.7	1.23
4	1.93	0.64	3.71	1.23	5.35	1.78	8.95	2.98
5	2.33	0.77	3.6	1.2	5.6	1.86	7.1	2.36
6	1.95	0.65	3.55	1.18	5.85	1.95	6.85	2.28
7	2.5	0.83	3.75	1.25	6.15	2.05	8.0	2.66
8	2.09	0.69	1.5	0.5	3.0	1.0	3.1	1.03
9	2.85	0.95	5.15	1.71	7.85	2.61	10.75	3.58
10	4.33	1.44	4.44	1.48	3.45	1.15	3.45	1.45
11	3.17	1.05	6.0	2.0	-	-	-	-
12	2.45	0.81	6.75	2.25	13.13	4.37	22.65	7.55
13	1.88	0.62	5.54	1.84	10.2	3.4	13.6	4.53
14	1.7	0.56	4.65	1.55	8.4	2.8	16.0	5.33
15	2.55	0.85	3.4	1.13	7.8	2.6	17.15	5.71
16	3.05	1.01	5.45	1.81	7.7	2.56	8.3	2.56
17	3.59	1.19	2.9	0.96	-	-	-	-
18	2.8	0.93	4.95	1.65	8.45	2.81	15.1	5.02
19	2.98	0.99	1.9	0.63	3.7	1.23	5.6	1.86
20	1.5	0.5	3.15	1.05	7.35	2.45	16.9	5.63
21	1.89	0.63	3.8	1.23	8.4	2.8	-	-
22	3.06	1.02	1.85	0.61	3.45	1.15	5.6	1.86
23	2.38	0.79	3.3	1.1	5.25	1.75	5.05	1.68
24	3.74	1.24	5.2	1.73	2.2	0.73	-	-

*Los tratamientos enunciados se dan en el Cuadro 2.
Cada tratamiento consiste de 3 repeticiones.

TABLA 2. PESOS TOTALES Y PROMEDIOS EN GRAMOS DEL CALLO AL INICIO Y EN CADA RESIEMBRA EN EL MEDIO LINSMAIER Y SKOOG (M2).

*TRATAMIENTOS	SIEMBRA INICIAL		1a. RESIEMBRA		2a. RESIEMBRA		3a. RESIEMBRA	
	Peso Total	Peso Prom.	Peso Total	Peso Prom.	Repet.	Peso Total	Repet.	Peso Total
1	1.65	0.55	0.85	0.28	-	-	-	-
2	1.8	0.6	0.8	0.26	3	1.25	3	5.3
3	2.2	0.73	2.0	0.66	3	1.1	2	3.0
4	1.3	0.43	2.65	0.88	3	2.7	4	10.55
5	2.05	0.68	2.5	0.83	3	4.2	3	9.55
6	1.55	0.51	2.0	0.66	3	1.45	3	1.9
7	1.35	0.45	1.9	0.63	2	4.4	6	15.35
8	2.55	0.85	5.05	1.68	7	18.45	14	69.35
9	2.55	0.85	5.75	1.91	6	17.8	17	59.8
10	1.75	0.58	3.8	1.26	5	11.0	11	24.6
11	2.9	0.96	6.55	2.18	7	23.35	17	64.85
12	3.9	1.3	7.97	2.65	6	20.75	15	43.4
13	2.4	0.8	5.2	1.73	5	13.7	9	25.15
14	3.0	1.0	6.75	2.25	8	25.95	20	75.95
15	1.55	0.51	0.95	0.31	3	4.0	3	10.2
16	3.55	1.18	6.25	2.08	6	18.6	14	45.1
17	3.15	1.05	6.1	2.03	6	20.0	14	45.45
18	3.3	1.1	5.1	1.7	4	13.6	9	34.8
19	3.25	1.08	-	-	-	-	-	-
20	1.6	0.53	2.15	0.71	4	8.9	6	23.9
21	2.4	0.8	5.3	1.76	5	15.3	13	41.7
22	3.4	1.13	8.55	2.85	7	23.75	12	46.25
23	3.3	1.1	8.55	2.85	8	31.35	22	91.15
24	3.05	1.01	6.2	2.06	5	14.25	15	55.0

*Los tratamientos enunciadas se dan en el Cuadro 2.
Cada tratamiento en la siembra inicial, como en la 1a. resiembra consistió de 3 repeticiones.

TABLA 3. PESOS TOTALES Y PROMEDIOS EN GRAMOS DEL CALLO AL INICIO Y EN CADA RESIEMBRA EN EL MEDIO ZUCCHERELLI (M3).

*TRATAMIENTOS	SIEMBRA INICIAL		1a. RESIEMBRA		2a. RESIEMBRA		3a. RESIEMBRA	
	Peso Total	Peso Prom.	Peso Total	Peso Prom.	Peso Total	Peso Prom.	Repet.	Peso Total
1	3.22	1.07	6.1	2.03	2.7	0.9	-	-
2	2.49	0.83	4.1	1.36	-	-	-	-
3	3.7	1.23	4.2	1.4	1.75	0.58	3	1.05
4	3.35	1.11	3.85	1.28	7.15	2.38	-	-
5	3.33	1.11	4.5	1.5	-	-	-	-
6	2.35	0.78	3.25	1.08	1.2	0.4	3	0.85
7	3.35	1.11	2.45	0.81	-	-	-	-
8	4.5	1.5	-	-	-	-	-	-
9	3.4	1.13	3.45	1.15	1.95	0.65	-	-
10	3.3	1.1	3.05	1.01	-	-	-	-
11	3.6	1.2	3.95	1.31	4.3	1.43	3	1.35
12	3.45	1.15	5.35	1.78	2.55	0.85	-	-
13	3.85	1.28	5.5	1.83	3.0	1.0	-	-
14	3.1	1.03	4.95	1.65	-	-	-	-
15	2.88	0.96	4.65	1.55	6.0	2.0	-	-
16	3.75	1.25	4.1	1.36	-	-	-	-
17	2.65	0.88	3.15	1.05	3.75	1.25	-	-
18	2.65	0.88	5.2	1.73	5.95	1.98	-	-
19	4.67	1.55	7.4	2.46	15.45	5.15	7	27.05
20	2.5	0.83	3.55	1.18	-	-	-	-
21	3.1	1.03	4.5	1.51	-	-	-	-
22	3.5	1.16	2.85	0.95	-	-	-	-
23	3.85	1.28	2.7	0.9	-	-	-	-
24	3.95	1.31	5.7	1.9	7.0	2.33	5	12.2

*Los tratamientos enunciados se dan en el Cuadro 2.
Cada tratamiento consistió de 3 repeticiones, excepto 2 en la 3a. resiembra.

a. Proliferación del callo

La fase de proliferación del callo proveyó de una gran población de tejido útil (Figura 11), ya que posteriormente este tejido originó plántulas. La formación de las plántulas se llevó a cabo debido a la totipotencialidad de estas células, ya que cada una tuvo la información genética necesaria para regenerar una planta completa (3, 5, 7, 38).

La mayoría de los cultivos de callo se derivan de tejido compuesto de células vacuoladas que pueden ser de dos tipos: aquellas de cambium vascular que siempre están en división octiva y las células del parénquima que son quiescentes y deben inducirse a la división (57).

La textura del callo fue esponjosa y fácilmente desmenuzable (36), la coloración verde, es decir clorofílico (Figura 11), fue igual al tejido que lo originó (36); a excepción del tejido en el medio M1, que 18 días después de la última resiembra se tornó cremoso (Figura 12). Esto pudo ser causado por algún error durante la preparación del medio de cultivo, alterando la apariencia del callo, pues a este medio se le proporcionaron los elementos necesarios para la formación de clorofila, como son los carbohidratos, disponibilidad de magnesio, fierro y nitrógeno, auxinas y citoquininas, luz y temperatura (3, 36). En el cuadro 1 se observa que la concentración total de sales minerales fue mayor en los medios M2 y M3 y menor en el M1, notándose además las diferentes fuentes de

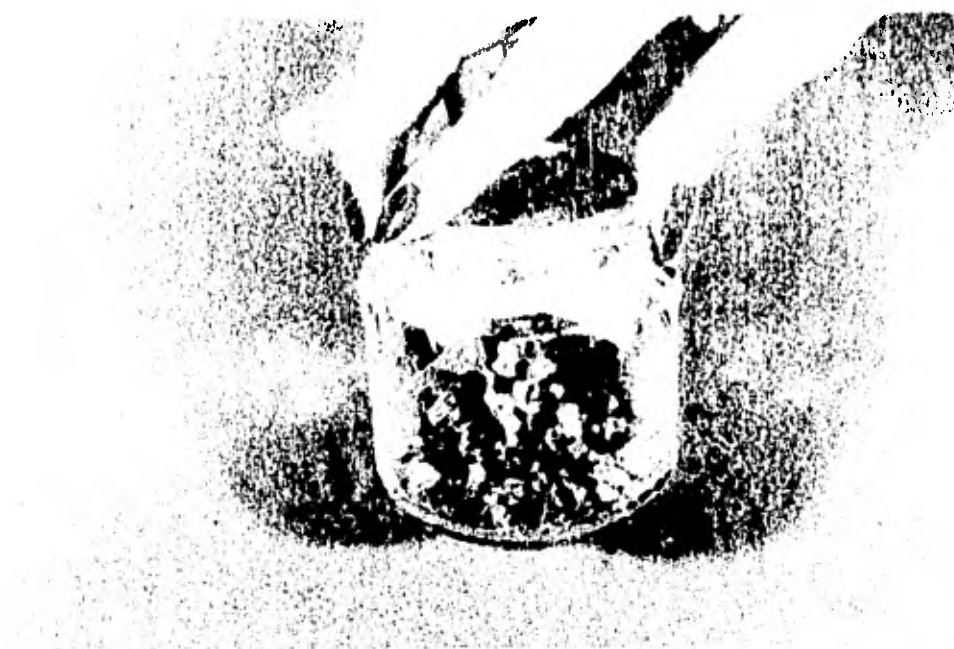


FIGURA 11. PROLIFERACION DEL CALLO CLOROFILICO.



FIGURA 12. TEJIDO CLOROTICO EN EL MEDIO REINHERT Y MOHR (RM).

nitrógeno, así como la carencia de fierro en el medio M3.

La cantidad de callo sembrado inicialmente en los tratamientos, considerando los medios nutritivos y las seis concentraciones de ANA y cuatro de BA, se comparó determinándose a través del ANOVA (Tabla 4) que no hubo diferencias significativas al 5%; ésto ora de esperarse ya que al ser la siembra inicial, todavía no se efectuaba ningún crecimiento del tejido, demostrando por lo tanto que la cantidad de tejido fue homogénea para cada tratamiento.

Antes de realizarse la primera resiembra y las dos siguientes, se eliminó tejido oxidado o contaminado de varios tratamientos en los tres medios y en algunos casos se tuvo que eliminar el tratamiento completo, como ocurrió en la mayoría de los tratamientos en el medio M3 (Tabla 3). Esto se debió a varias razones, una de ellas fue la pronta acumulación de desechos tóxicos en el medio de cultivo, provocado por la gran proliferación del tejido, los cuales causaron el ennegrecimiento u oxidación del callo que se encontraba en mayor contacto con el medio, disminuyendo el crecimiento del resto del tejido. La contaminación se debió a la presencia de algunos agentes microbionos, como bacterias y hongos, en el tejido, inhibiendo éstos el crecimiento del callo. Aunque la mayoría de las veces estos contaminantes se observaron hasta el tercer día con la destrucción del tejido, otros fueron de crecimiento poco notorio, haciéndose menos conspicuos y causando por ésto considerables daños (56).

TABLA 4. ANOVA DEL PESO FRESCO DEL CALLO EN LA SIEMBRA INICIAL Y 1a. RESIEMBRA EN UN MODELO CON ARREGLO FACTORIAL, CONSIDERANDO LOS MEDIOS Y LAS HORMONAS CON UN DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR.

<u>F. V.</u>	<u>G. L.</u>	SIEMBRA INICIAL		1a. RESIEMBRA	
		<u>C. M.</u>	<u>F. c.</u>	<u>C. M.</u>	<u>F. c.</u>
TRATAMIENTOS	71	0.21	0.23	1.17	10.63*
ANA	5	0.23	0.25	1.44	13.09*
BA	3	0.6	0.6	2.29	20.81*
M	2	1.87	2.0	0.24	2.18
ANA x BA	15	0.18	0.2	0.97	8.81*
ANA x M	10	0.12	0.13	1.45	13.18*
BA x M	6	0.12	0.13	2.53	23.0 *
ANA x BA x M	30	0.11	0.12	0.81	7.36*
E. E.	144	0.9		0.11	
TOTAL	215				

F.V. = Fuente de variación
G.L. = Grados de libertad
C.M. = Cuadrados medios
F.c. = F calculada

La composición del medio nutritivo o bien con ANA (como auxino) y/o BA (como citocinina) indujo diferentes efectos en la proliferación del collo. La auxina promueve el crecimiento (aumento en volúmen) de la célula e induce su alargamiento, mientras que la citocinina principalmente activa la división celular; estos efectos de ambas hormonas no son únicos, ya que también la auxina tiene cierto efecto en la división y la citocinina promueve un poco el alargamiento (41) y se ha demostrado que la proliferación del callo "in vitro" depende grandemente del balance entre ambas hormonas (35).

La cantidad de callo transcurridos los 21 días de cultivo (primera resiembra) en los tratamientos, considerando los tres medios y los niveles hormonales de ANA y BA, se comparó encontrándose (Tabla 4) diferencias significativas al 5% para los efectos principales de ANA y BA, así como para todas las interacciones. Al realizar las comparaciones múltiples por el método de Tukey (Tabla 5), las pesos promedias mayores, que fueron iguales estadísticamente, se obtuvieron con 2.0 y 1.6 mg/l de ANA, mientras que con 0.1 mg/l de ANA la cantidad fue menor y diferente estadísticamente a las demás; con la citocinina los pesos promedios con 0.1, 0.5 y 1.0 mg/l de BA fueron mayores e iguales estadísticamente entre sí.

Como las interacciones fueron también significativas se procedió a buscar dentro de cada medio los mejores tratamientos, encontrándose de aquí que al usar en el medio M1 (Tabla 6) y M2 (Tabla 7) los tratamientos de 0.1 mg/l de BA con 1.6 y 2.0 mg/l de ANA se obtuvieron cantidades similares de teji-

TABLA 5. COMPARACIONES MULTIPLES EN LOS EFECTOS PRINCIPALES DE ANA Y BA SOBRE LOS PESOS PROMEDIOS EN GRAMOS DEL CALLO EN LA 1ª. RESIEMBRA EN LOS 3 MEDIOS.

ANA (mg/l)	2.0	1.6	0.8	0.2	0.0	0.1
\bar{x}	1.7	1.49	1.4	1.27	1.21	1.13

BA (mg/l)	0.5	0.1	1.0	0.0
\bar{x}	1.57	1.42	1.41	1.06

(Nota): Los promedios contenidos en una misma línea, estadísticamente son iguales.

TABLA 6. PESOS TOTALES Y PROMEDIOS EN GRAMOS DE LA 1^a. RESIEMBRA EN LOS TRATAMIENTOS CONSIDERANDO LA INTERACCION ANA x BA EN EL MEDIO REINERT Y MOHR (M1)

ANA (mg/l) BA (mg/l)	0.0	0.1	0.2	0.8	1.6	2.0		
	*T ** \bar{x}	T \bar{x}	T \bar{x}	T \bar{x}	T \bar{x}	T \bar{x}	T	\bar{x}
0.0	3.3 1.1	4.19 1.39	2.55 0.85	3.71 1.23	3.6 1.2	3.55 1.18	20.9	1.16
0.1	3.75 1.25	1.5 0.5	5.15 1.71	4.44 1.48	6.0 2.0	6.75 2.25	27.59	1.53
0.5	5.54 1.84	4.65 1.55	3.4 1.13	5.45 1.81	2.9 0.96	4.95 1.65	26.89	1.49
1.0	1.9 0.63	3.15 1.05	3.8 1.26	1.85 0.61	3.3 1.1	5.2 1.73	19.2	1.06
T	14.49	13.49	14.9	15.45	15.8	20.45	94.58	
\bar{x}	1.2	1.12	1.24	1.28	1.31	1.7		1.31

*Total
**Promedio

TABLA 7. PESOS TOTALES Y PROMEDIOS EN GRAMOS DE LA 1^a. RESIEMBRA EN LOS TRATAMIENTOS CONSIDERANDO LA INTERACCION ANA x BA EN EL MEDIO LINSMAIER Y SKOOG (M2).

ANA (mg/l) BA (mg/l)	0.0		0.1		0.2		0.8		1.6		2.0			
	*T	** \bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}		
0.0	0.85	0.28	0.8	0.26	2.0	0.66	2.65	0.88	2.5	0.83	2.0	0.66	10.8	0.6
0.1	1.9	0.63	5.05	1.68	5.75	1.91	3.8	1.26	6.55	2.18	7.97	2.65	31.02	1.72
0.5	5.2	1.73	6.75	2.25	0.95	0.31	6.25	2.08	6.1	2.03	5.1	1.7	30.35	1.68
1.0	-	-	2.15	0.71	5.3	1.76	8.55	2.85	8.55	2.85	6.2	2.06	30.75	1.7
T	7.95		14.75		14.0		21.25		23.7		21.27		102.92	
\bar{x}	0.66		1.22		1.16		1.77		1.97		1.77			1.42

*Total
**Promedio

do, mayores a los 2 g. Es importante mencionar que en el medio M2 (Tabla 7) con los tratamientos de 1.6 y 0.8 mg/l de ANA con 1.0 mg/l de BA se obtuvo el mayor peso promedio que en el resto de los tratamientos en los 3 medios; sin embargo en este mismo medio, donde se empleó 0.1, 0.8 y 1.6 mg/l de BA y 2.0 mg/l de ANA con 1.0 mg/l de BA también se obtuvieron pesos promedios de callo mayores a los 2 g.

En el medio M3 (Tabla 8) el tratamiento carente de hormonas y en el de 1.0 mg/l de BA se obtuvieron los mayores pesos promedios de callo, siendo muy similares a los obtenidos en el medio M1 con los tratamientos de 2.0 y 1.6 mg/l de ANA con 0.1 mg/l de BA y en los últimos tratamientos mencionados para el medio M2.

Estos primeros resultados en los medios M2 y M3 concordaron con lo reportado (35, 37), ya que la mayor proliferación de callo estuvo determinada por la acción de una mayor concentración de ANA que de BA. No sucediendo lo mismo para el medio M3 donde principalmente la proliferación fue determinada por el efecto de la dosis más alta empleado de BA en dicho medio.

De manera más explícita para observar en esta primera resiembra, la interacción mencionada anteriormente, se realizó el ANOVA en cada uno de los medios (Tabla 9) donde se determinaron diferencias significativas al 5% tanto en los efectos principales como en las interacciones; al realizar las comparaciones múltiples en los efectos de ANA y BA se observó (Tabla 10) que en el medio M1 al usar 2.0 mg/l de ANA, así como

TABLA 8. PESOS TOTALES Y PROMEDIOS EN GRAMOS DE LA 1ª, RESIEMBRA EN LOS TRATAMIENTOS CONSIDERANDO LA INTERACCION ANA x BA EN EL MEDIO ZUCCHERELLI (M3).

ANA (mg/l) BA (mg/l)	0.0		0.1		0.2		0.8		1.6		2.0			
	*T	** \bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}
0.0	6.1	2.03	4.1	1.36	4.2	1.4	3.85	1.28	4.5	1.5	3.25	1.08	26.0	1.44
0.1	2.45	0.81	-	-	3.45	1.15	3.05	1.01	3.95	1.31	5.35	1.78	18.25	1.01
0.5	5.5	1.83	4.95	1.65	4.65	1.55	4.1	1.36	3.15	1.05	5.2	1.73	27.55	1.53
1.0	7.4	2.46	3.55	1.18	4.55	1.51	2.85	0.95	2.7	0.9	5.7	1.9	26.75	1.48
T	21.45		12.6		16.85		13.85		14.3		19.5		98.55	
\bar{x}	1.78		1.05		1.4		1.15		1.19		1.62			1.36

*Total
**Promedio

TABLA 9. ANOVA DEL PESO FRESCO DEL CALLO EN LA 1ª. RESIEMBRA EN UN MODELO CON ARREGLO FACTORIAL, CONSIDERANDO LAS HORMONAS DENTRO DE CADA MEDIO CON UN DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR.

1ª. RESIEMBRA

<u>F. V.</u>	<u>G. L.</u>	M1		M2		M3	
		<u>C. M.</u>	<u>F. c.</u>	<u>C. M.</u>	<u>F. c.</u>	<u>C. M.</u>	<u>F. c.</u>
TRATAMIENTOS	23	0.6	6.6 *	2.28	15.2 *	0.72	7.2 *
ANA	5	0.49	5.4 *	2.95	19.66*	1.01	10.1 *
BA	3	0.98	10.88*	5.51	36.73*	1.02	10.2 *
ANA x BA	15	0.55	6.1	1.41	9.4 *	0.57	5.7 *
E. E.	48	0.09		0.15		0.1	
TOTAL	71						

M1= Reinert y Mohr
M2= Linsmaier y Skoog
M3= Zuccherelli

TABLA 10. COMPARACIONES MULTIPLES EN LOS EFECTOS PRINCIPALES DE ANA Y BA SOBRE LOS PESOS PROMEDIOS EN GRAMOS DEL CALLO EN LA 1^a. RESIEMBRA EN CADA UNO DE LOS MEDIOS.

		M1					
ANA (mg/l)		2.0	1.6	0.8	0.2	0.0	0.1
\bar{x}		1.7	1.31	1.28	1.24	1.2	1.12
		<hr/>					
BA (mg/l)			0.1	0.5	0.0	1.0	
\bar{x}			1.53	1.49	1.16	1.06	
		<hr/>					
		M2					
ANA (mg/l)		1.6	2.0	0.8	0.1	0.2	0.0
\bar{x}		1.97	1.77	1.77	1.22	1.16	0.66
		<hr/>					
BA (mg/l)			0.1	1.0	0.5	0.0	
\bar{x}			1.72	1.7	1.68	0.6	
		<hr/>					
		M3					
ANA (mg/l)		0.0	2.0	0.2	1.6	0.8	0.1
\bar{x}		1.78	1.62	1.4	1.19	1.15	1.05
		<hr/>					
BA (mg/l)			0.5	1.0	0.0	0.1	
\bar{x}			1.53	1.48	1.44	1.01	
		<hr/>					

0.1 y 0.5 mg/l de BA los pesos promedios del callo fueron mayores estadísticamente; en el medio M2 los pesos promedios mayores de callo se obtuvieron en las mismas concentraciones que en el medio M1, incluyendo además la dosis de 0.8 y 1.6 mg/l de ANA como 1.0 mg/l de BA. Para el medio M3 se obtuvieron con la misma dosis de BA que en el medio M2 mientras que para el ANA fueron en 2.0, 0.2 y 0.0 mg/l.

Es importante hacer notar, que aún cuando no hubo diferencias significativas para el efecto de los medios (Tabla 4) la mayor cantidad de tejido se obtuvo principalmente en el medio M2.

Posteriormente con las tablas 6, 7 y 8 se tomaron los pesos promedios para realizar las comparaciones múltiples de la interacción en cada uno de los medios (Tabla 11), notando con mayor claridad que al interactuar las tres concentraciones más altas de ANA con 0.1, 0.5 y 1.0 mg/l de BA en el medio M2, se obtuvieron pesos promedios mayores a los 2 g y en el medio M1 únicamente en 0.1 mg/l de BA con 2.0 y 1.6 mg/l de ANA. Para el medio M3 se obtuvieron en 2.0 mg/l de ANA con 1.0, 0.5 y 0.1 mg/l de BA y en los tratamientos de 0.0, 0.5 y 1.0 mg/l de BA.

A partir de la segunda resiembra (42 días en cultivo), como se mencionó en materiales y métodos, únicamente se realizó el análisis para el medio M1 y M3 y en la tercera resiembra y última (63 días en cultivo), únicamente para el medio M1. Sin embargo se hizo también una comparación considerando los pesos totales en los tres medios.

TABLA 11. COMPARACIONES MULTIPLES EN LA INTERACCION ANA x BA SOBRE EL PESO PROMEDIO EN GRAMOS DEL CALLO EN LA 1a. RESIEMBRA EN CADA UNO DE LOS MEDIOS.

	M1				M2				M3			
*ANA	----- 0.0 -----				----- 0.0 -----				----- 0.0 -----			
*BA	0.5	0.1	0.0	1.0	0.5	0.1	0.0	1.0	1.0	0.0	0.5	0.1
\bar{x}	<u>1.84</u>	<u>1.25</u>	1.1	0.63	1.73	<u>0.63</u>	0.28	0.0	<u>2.46</u>	<u>2.03</u>	<u>1.83</u>	0.81
ANA	----- 0.1 -----				----- 0.1 -----				----- 0.1 -----			
BA	0.5	0.0	1.0	0.1	0.5	0.1	1.0	0.0	0.5	0.0	1.0	0.1
\bar{x}	<u>1.55</u>	<u>1.39</u>	<u>1.05</u>	0.5	2.25	<u>1.68</u>	<u>0.71</u>	0.26	<u>1.65</u>	<u>1.36</u>	<u>1.18</u>	0.0
ANA	----- 0.2 -----				----- 0.2 -----				----- 0.2 -----			
BA	0.1	1.0	0.5	0.0	0.1	1.0	0.0	0.5	0.5	1.0	0.0	0.1
\bar{x}	<u>1.71</u>	<u>1.26</u>	<u>1.13</u>	0.85	<u>1.91</u>	<u>1.76</u>	<u>0.66</u>	0.31	<u>1.55</u>	<u>1.51</u>	<u>1.4</u>	<u>1.15</u>
ANA	----- 0.8 -----				----- 0.8 -----				----- 0.8 -----			
BA	0.5	0.1	0.0	1.0	1.0	0.5	0.1	0.0	0.5	0.0	0.1	1.0
\bar{x}	<u>1.81</u>	<u>1.48</u>	<u>1.23</u>	0.61	<u>2.85</u>	<u>2.08</u>	<u>1.26</u>	0.88	<u>1.36</u>	<u>1.28</u>	<u>1.01</u>	<u>0.95</u>
ANA	----- 1.6 -----				----- 1.6 -----				----- 1.6 -----			
BA	0.1	0.0	1.0	0.5	1.0	0.1	0.5	0.0	0.0	0.1	0.5	1.0
\bar{x}	2.0	<u>1.2</u>	<u>1.1</u>	<u>0.96</u>	<u>2.85</u>	<u>2.18</u>	<u>2.03</u>	0.83	<u>1.5</u>	<u>1.31</u>	<u>1.05</u>	<u>0.9</u>
ANA	----- 2.0 -----				----- 2.0 -----				----- 2.0 -----			
BA	0.1	1.0	0.5	0.0	0.1	1.0	0.5	0.0	1.0	0.1	0.5	0.0
\bar{x}	<u>2.25</u>	<u>1.73</u>	<u>1.65</u>	1.18	<u>2.65</u>	<u>2.06</u>	1.7	0.66	<u>1.9</u>	<u>1.78</u>	<u>1.73</u>	<u>1.08</u>

*(mg/l)

El ANOVA para dichos medios determinó (Tablas 12, 13 y 14) que existieron diferencias significativas al 5%.

En el medio M1 las comparaciones múltiples para los efectos principales de ANA y BA en estas dos últimas resiembras determinaron (Tablas 15 y 16) que únicamente con el efecto de 2.0 mg/l de ANA, el peso promedio continuó siendo mayor pero igual estadísticamente a los obtenidos en 0.1 y 0.2 mg/l, excepto esta última concentración en la última resiembra; con la BA solamente el efecto de 0.5 mg/l fue mayor y diferente estadísticamente a los restantes en ambas resiembras. Estos efectos se muestran más claramente al tomar los pesos promedios en la interacción (Tablas 17 y 18), para realizar las comparaciones múltiples donde se determinó (Tablas 19 y 20) que el mayor peso promedio, al igual que en la primera resiembra, se siguió obteniendo en el tratamiento de 2.0 mg/l de ANA con 0.1 mg/l de BA, siendo además diferente estadísticamente a los restantes en estas dos resiembras, donde el peso promedio en la última resiembra fue de 7.55 g de callo (Tabla 20). En el tratamiento con 0.5 mg/l de BA en la segunda resiembra (Tabla 19), el peso promedio fue satisfactorio siendo diferente estadísticamente a los demás; en la última resiembra (Tabla 20) esta concentración de BA con 0.1, 0.2 y 2.0 mg/l de ANA dieron buenos resultados, donde la cantidad de tejido fue mayor a los 5 g.

En el medio M2, podemos observar (Tablas 21 y 22) que el tratamiento de 1.6 mg/l de ANA con 1.0 mg/l de BA continuó

TABLA 12. ANOVA DEL PESO FRESCO DEL CALLO EN LA 2ª. RESIEMBRA EN UN MODELO CON ARREGLO FACTORIAL CONSIDERANDO LAS HORMONAS EN EL MEDIO REINERT Y MOHR (M1) CON UN DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR.

<u>F. V.</u>	<u>G. L.</u>	<u>C. M.</u>	<u>F. c.</u>
TRATAMIENTOS	23	3.3	25.38*
ANA	5	3.69	28.38*
BA	3	1.85	14.23*
ANA x BA	15	3.45	26.53*
E. E.	48	0.13	
TOTAL	71		

TABLA 13. ANOVA DEL PESO FRESCO DEL CALLO EN LA 2ª. RESIEMBRA EN UN DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR EN EL MEDIO ZUCCHERELLI (M3).

<u>F. V.</u>	<u>G. L.</u>	<u>C. M.</u>	<u>F. c.</u>
TRATAMIENTOS	12	4.74	14.81*
E. E.	26	0.32	
TOTAL	38		

TABLA 14. ANOVA DEL PESO FRESCO DEL CALLO EN LA 3ª. RESIEMBRA EN UN MODELO CON ARREGLO FACTORIAL CONSIDERANDO LAS HORMONAS EN EL MEDIO REINERT Y MOHR (M1) CON UN DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR.

<u>F. V.</u>	<u>G. L.</u>	<u>C. M.</u>	<u>F. c.</u>
TRATAMIENTOS	23	12.91	16.34*
ANA	5	13.96	17.67*
BA	3	13.28	16.81*
ANA x BA	15	12.48	15.79*
E. E.	48	0.79	
TOTAL	71		

TABLA 15. COMPARACIONES MULTIPLES EN LOS EFECTOS PRINCIPALES DE ANA Y BA SOBRE LOS PESOS PROMEDIOS EN GRAMOS DEL CALLO EN LA 2^a. RESIEMBRA EN EL MEDIO REINERT Y MOHR (M1).

ANA (mg/l)	2.0	0.2	0.1	0.0	0.8	1.6
\bar{x}	<u>2.46</u>	<u>2.2</u>	<u>2.15</u>	<u>2.0</u>	<u>1.66</u>	0.9

BA (mg/l)	0.5	0.1	0.0	1.0
\bar{x}	2.36	<u>1.86</u>	<u>1.68</u>	<u>1.68</u>

TABLA 16. COMPARACIONES MULTIPLES EN LOS EFECTOS PRINCIPALES DE ANA Y BA SOBRE LOS PESOS PROMEDIOS EN GRAMOS DEL CALLO EN LA 3^a, RESIEMBRA EN EL MEDIO REINERT Y MOHR (M1).

ANA (mg/l)	0.1	2.0	0.0	0.2	0.8	1.6
\bar{x}	3.99	3.71	2.79	2.63	2.19	1.01
<hr/>						
BA (mg/l)	0.5	0.1	0.0	1.0		
\bar{x}	3.89	2.66	2.48	1.84		
<hr/>						

TABLA 17. PESOS TOTALES Y PROMEDIOS EN GRAMOS DE LA 2ª. RESIEMBRA EN LOS TRATAMIENTOS CONSIDERANDO LA INTERACCION ANA x BA EN EL MEDIO REINERT Y MOHR (M1).

ANA (mg/l) BA (mg/l)	0.0		0.1		0.2		0.8		1.6		2.0			
	*T	** \bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}
0.0	4.0	1.3	7.05	2.35	2.45	0.81	5.35	1.78	5.6	1.86	5.85	1.95	30.3	1.68
0.1	6.15	2.05	3.0	1.0	7.85	2.61	3.45	1.15	-	-	13.13	4.37	33.58	1.86
0.5	0.2	3.4	8.4	2.8	7.8	2.6	7.7	2.56	-	-	8.45	2.81	42.55	2.36
1.0	3.7	1.23	7.35	2.45	8.4	2.8	3.45	1.15	5.25	1.75	2.2	0.73	30.35	1.68
T	24.05		25.8		26.5		19.95		10.85		29.63		136.78	
\bar{x}	2.0		2.15		2.2		1.66		0.9		2.46			1.89

*Total
**Promedio

TABLA 18. PESOS TOTALES Y PROMEDIOS EN GRAMOS DE LA 3a. RESIEMBRA EN LOS TRATAMIENTOS CONSIDERANDO LA INTERACCION ANA x BA EN EL MEDIO REINERT Y MOHR (M1).

ANA (mg/l) BA (mg/l)	0.0		0.1		0.2		0.8		1.6		2.0			
	*T	** \bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}		
0.0	6.3	2.1	11.9	3.96	3.7	1.23	8.95	2.98	7.1	2.36	6.85	2.28	44.8	2.48
0.1	8.0	2.66	3.1	1.03	10.75	3.58	3.45	1.15	-	-	22.65	7.55	47.95	2.66
0.5	13.6	4.53	16.0	5.33	17.15	5.71	8.3	2.76	-	-	15.1	5.03	70.15	3.89
1.0	5.6	1.86	16.9	5.63	-	-	5.6	1.86	5.05	1.68	-	-	33.15	1.84
T	33.5		47.9		31.6		26.3		12.15		44.6		196.05	
\bar{x}	2.79		3.99		2.63		2.19		1.01		3.71		2.72	

*Total
**Promedio

TABLA 19. COMPARACIONES MULTIPLES EN LA INTERACCION ANA x BA
 SOBRE LOS PESOS PROMEDIOS DEL CALLO EN GRAMOS EN
 LA 2a. RESIEMBRA EN EL MEDIO
 REINERT Y MOHR (M1).

ANA BA (mg/l)	----- 0.0 -----			
	0.5	0.1	0.0	1.0
\bar{x}	3.4	2.05	1.3	1.23
<hr/>				
ANA BA (mg/l)	----- 0.1 -----			
	0.5	1.0	0.0	0.1
\bar{x}	2.8	2.45	2.35	1.0
<hr/>				
ANA BA (mg/l)	----- 0.2 -----			
	1.0	0.1	0.5	0.0
\bar{x}	2.8	2.61	2.6	0.81
<hr/>				
ANA BA (mg/l)	----- 0.8 -----			
	0.5	0.0	0.1	1.0
\bar{x}	2.56	1.78	1.15	1.15
<hr/>				
ANA BA (mg/l)	----- 1.6 -----			
	0.0	1.0	0.1	0.5
\bar{x}	1.86	1.75	0.0	0.0
<hr/>				
ANA BA (mg/l)	----- 2.0 -----			
	0.1	0.5	0.0	1.0
\bar{x}	4.37	2.81	1.95	0.73
<hr/>				

TABLA 20. COMPARACIONES MULTIPLES EN LA INTERACCION ANA x BA
 SOBRE LOS PESOS PROMEDIOS EN GRAMOS DEL CALLO EN
 LA 3^a. RESIEMBRA EN EL MEDIO
 REINERT Y MOHR (M1).

ANA BA (mg/l)	----- 0.0 -----
	0.5 0.1 0.0 1.0
\bar{x}	<u>4.53 2.66 2.1 1.86</u>

ANA BA (mg/l)	----- 0.1 -----
	1.0 0.5 0.0 0.1
\bar{x}	<u>5.63 5.33 3.96 1.03</u>

ANA BA (mg/l)	----- 0.2 -----
	0.5 0.1 0.0 1.0
\bar{x}	<u>5.71 3.58 1.23 0.0</u>

ANA BA (mg/l)	----- 0.8 -----
	0.0 0.5 1.0 0.1
\bar{x}	<u>2.98 2.76 1.86 1.15</u>

ANA BA (mg/l)	----- 1.6 -----
	0.0 1.0 0.5 0.1
\bar{x}	<u>2.36 1.68 0.0 0.0</u>

ANA BA (mg/l)	----- 2.0 -----
	0.1 0.5 0.0 1.0
\bar{x}	<u>7.55 5.03 2.28 0.0</u>

TABLA 21. PESOS TOTALES EN GRAMOS DE LA 2^a. RESIEMBRA EN LOS TRATAMIENTOS CONSIDERANDO LA INTERACCION ANA x BA EN EL MEDIO LINSMAIER Y SKOOG (M2).

ANA (mg/l) \ BA (mg/l)	0.0	0.1	0.2	0.8	1.6	2.0
	*T	T	T	T	T	T
0.0	-	1.25	1.1	2.7	4.2	1.45
0.1	4.4	18.45	17.8	11.0	23.35	20.75
0.5	13.7	25.95	4.0	18.6	20.0	13.6
1.0	-	8.9	15.3	23.75	31.35	14.25

*Total

TABLA 22. PESOS TOTALES EN GRAMOS DE LA 3a. RESIEMBRA EN LOS TRATAMIENTOS CONSIDERANDO LA INTERACCION ANA x BA EN EL MEDIO LINSMAIER Y SKOOG (M2).

ANA (mg/l) BA (mg/l)	0.0	0.1	0.2	0.8	1.6	2.0
	*T	T	T	T	T	T
0.0	-	5.3	3.0	10.55	9.55	1.9
0.1	15.35	69.35	59.8	24.6	64.85	43.4
0.5	23.15	75.95	10.2	45.1	45.45	34.8
1.0	-	23.9	41.7	46.25	91.15	55.0

*Total

siendo el mejor, obteniéndose finalmente un peso total de 91.15 g de callo. En la segunda resiembra (Tabla 21) el tratamiento de 0.1 mg/l de ANA con 0.5 mg/l de BA superó la cantidad de tejido obtenido en 0.8 mg/l de ANA con 1.0 mg/l de BA en la primera resiembra (Tabla 11).

Al igual que el medio M1, en el medio M2 siempre se obtuvo una mayor cantidad de tejido en el tratamiento con 0.5 mg/l de BA, que en otros donde se empleó únicamente ANA o cualquier otra concentración de BA (Tablas 21 y 22); sin embargo en estos tratamientos, la cantidad de callo en la última resiembra fue baja comparada con la mayoría de los tratamientos donde ambas hormonas interactuaron (Tabla 22).

En el medio M3, a partir de los pesos promedios en cada tratamiento (Tabla 23), se realizaron las comparaciones múltiples (Tabla 24), determinando al igual que en la primera resiembra, que el peso promedio de 5.15 g de callo se obtuvo con 1.0 mg/l de BA, pero en este caso fue diferente estadísticamente a todos los demás, mientras que en los tratamientos de 0.8 mg/l de ANA, 2.0 mg/l de ANA con 1.0 mg/l de BA, y 0.2 mg/l de ANA con 0.5 mg/l de BA se obtuvo poco más de los 2 g.

Después de la segunda resiembra, la mayoría de los tratamientos, en este medio, fueron eliminados quedando un total de cinco tratamientos (Tabla 25), de los cuales dos fueron en los que se obtuvo siempre la mayor cantidad de callo, mientras que en los restantes el máximo de tejido total fue de 1.35 g.

TABLA 23. PESOS TOTALES Y PROMEDIOS EN GRAMOS DE LA 2^a. RESIEMBRA EN LOS TRATAMIENTOS CONSIDERANDO LA INTERACCION ANA x BA EN EL MEDIO ZUCCHERELLI (M3).

ANA (mg/l) BA (mg/l)	0.0		0.1		0.2		0.8		1.6		2.0	
	*T	** \bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}
0.0	2.7	0.9	-	-	1.75	0.58	7.15	2.8	-	-	1.2	0.4
0.1	-	-	-	-	1.95	0.65	-	-	4.3	1.43	2.55	0.85
0.5	3.0	1.0	-	-	6.0	2.0	-	-	3.75	1.25	5.95	1.98
1.0	15.45	5.15	-	-	-	-	-	-	-	-	7.0	2.33

*Total
**Promedio

TABLA 24. COMPARACIONES MULTIPLES DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LOS PESOS PROMEDIOS EN GRAMOS DEL CALLO EN LA 2^a. RESIEMBRA EN EL MEDIO ZUCCHERELLI (M3).

TRATAMIENTOS	19	4	24	15	18	11	17	13	1	12	9	3	6
ANA	0.0	0.8	2.0	0.2	2.0	1.6	1.6	0.0	0.0	2.0	0.2	0.2	2.0
BA (mg/l)	1.0	0.0	1.0	0.5	0.5	0.1	0.5	0.5	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0
\bar{x}	5.15	2.38	2.33	2.0	1.98	1.43	1.24	1.0	0.9	0.85	0.65	0.58	0.4

TABLA 25. PESOS TOTALES EN GRAMOS DE LA 3ª. RESIEMBRA EN LOS TRATAMIENTOS CONSIDERANDO LA INTERACCION ANA x BA EN EL MEDIO ZUCCHERELLI (M3).

ANA (mg/l) \ BA (mg/l)	0.0	0.1	0.2	0.8	1.6	2.0
	*T	T	T	T	T	T
0.0	-	-	1.05	-	-	0.85
0.1	-	-	-	-	1.35	-
0.5	-	-	-	-	-	-
1.0	27.05	-	-	-	-	12.2

*Total

Es importante mencionar nuevamente que en los medios M1 y M2 se llevó a cabo una mayor proliferación de callo en aquellos tratamientos con una mayor concentración de auxina que de citocinina en el medio (35, 37). Como también al comparar los pesos frescos totales de cada tratamiento en los tres medios (Tablas 1, 2 y 3), en estas dos últimas resiembras, se observó que la mayor cantidad de callo se obtuvo en el medio M2 mientras que en el medio M3 fue la menor.

Se puede deducir, de estos resultados, que el mejor medio donde se indujo la mayor proliferación de callo fue el medio Linsmaier y Skoog (M2) ya que en cada resiembra la cantidad de tejido aumentó considerablemente en la mayoría de los tratamientos, mientras que en el medio Reinert y Mohr (M1) y Zuccherelli (M3) la cantidad de tejido aumentó, pero no tan considerablemente como el anterior, además de que en ambos medios no hubo proliferación en varios tratamientos.

El éxito de esta mayor proliferación en el medio M2 puede atribuirse principalmente a la mayor concentración total de sales inorgánicas y al suplemento de tiamina como única vi tamina en una mayor concentración que en los demás medios y así también el uso del inositol; estas sustancias orgánicas son esenciales para el crecimiento de muchos tejidos vegetales (24, 33, 56), al interactuar con la auxina y citocinina o bien únicamente con la citocinina como se pudo observar experimentalmente.

b. Inducción a la diferenciación

Se demostró que la mayor proliferación de tejido indiferenciado dependió del balance hormonal en el medio de cultivo. Así mismo, para la inducción a la diferenciación del tejido clorofílico se requirió de un nivel mayor de citocinina (BA) que de auxina (ANA), favoreciendo ésto a una mayor morfogénesis (50), ya que la citocinina cuando está en concentraciones mayores que la auxina induce la diferenciación del callo (27).

La cantidad de tejido clorofílico y clorótico sembrado inicialmente en el medio Linsmaier y Skoog, para su inducción a la diferenciación fue homogénea para cada tratamiento (Tabla 26). En el tejido indiferenciado clorótico no hubo ningún signo de diferenciación aparente, ni de crecimiento, lo cual fue un indicio de que su potencialidad fue afectada (Figura 13). En cambio, en el callo clorofílico el primer signo de diferenciación se observó después de 36 días en cultivo, con la formación de pequeños cuerpos esféricos parecidos a protocormos (Figura 14), los cuales se formaron principalmente en los tratamientos donde se empleó ANA con 0.5 o 2.0 mg/l de BA.

La formación de brotes foliares comenzó a observarse aproximadamente a los 90 días, algunos se diferenciaron a partir del callo directamente, mientras que los otros se desarrollaron a partir de los cuerpos esféricos parecidos a protocormos (Figura 15); estos dos tipos de diferenciación inicial también han sido observados en el género Cattleya (33).

TABLA 26. PESOS TOTALES Y PROMEDIOS EN GRAMOS DEL CALLO CLOROFILICO Y CLOROTICO SEMBRADO INICIALMENTE PARA LA INDUCCION A LA DIFERENCIACION EN EL MEDIO LINSMAIER Y SKOOG.

*TRATAMIENTOS	CLOROFILICO		CLOROTICO	
	T	\bar{x}	T	\bar{x}
1	1.4	0.4	1.4	0.4
2	1.8	0.6	1.3	0.4
3	1.4	0.4	1.6	0.5
4	1.7	0.5	1.6	0.5
5	1.4	0.4	1.7	0.5
6	1.5	0.5	1.6	0.5
7	1.3	0.4	1.5	0.5
8	1.6	0.5	1.4	0.4
9	1.4	0.4	1.3	0.4
10	1.6	0.5	1.7	0.5
11	1.6	0.5	1.4	0.4
12	1.5	0.5	1.6	0.5

* Los tratamientos enunciados se dan en el Cuadro 3.



FIGURA 13. CALLO CLOROTICO CON NINGUN SIGNO DE DIFERENCIACION APARENTE.



FIGURA 14. DIFERENCIACION DEL CALLO CLOROTICO EN PEQUEÑOS PROTOCORNOS.



FIGURA 15. FORMACION DE BROTES FOLIARES A PARTIR DE: a. PROTOCORMOS O b. DIRECTAMENTE DEL CALLO.

Se ha mencionado que los primeros signos de morfogénesis se observaron principalmente en los tratamientos con hormonas, sin embargo es importante hacer notar que el cultivo de callo se diferenció en plántulas sin adición externa de hormonas al medio, aproximadamente a los 110 días de cultivo. Esto puede explicarse ya que se ha reportado (9, 43), que el cultivo de callo de orquídea "in vitro" se diferencia al igual que en la semilla durante su germinación, la cual crece como una masa de células indiferenciadas (26), las que eventualmente forman protocormos de forma esférica que posteriormente desarrollarán hojas y raíces (4) (Figura 16). Se puede considerar que los nuevos protocormos formados a partir del cultivo de callo son embriones adventicios (33) (Figura 17).

Los protocormos en su mayoría formaron racimos (33), por lo que en cada resiembra se trató de individualizarlos; éstos y los que continuaron unidos se desarrollaron en brotes foliares, los cuales también fueron separados (Figura 18). Aquellos que no se lograron individualizar provocaron la formación de plántulas fusionadas.

A los 210 días (siete meses) aproximadamente, la mayoría de los brotes foliares, formaron plántulas bien desarrolladas, es decir, tenían una altura de 1 a 2 cm y presentaban dos o más hojas en forma lanceolada (Figura 19); por lo tanto con la formación de estas plántulas se estableció, en este tiempo, la última resiembra. La proliferación del callo restante continuó, así como la diferenciación de protocormos y desarrollo

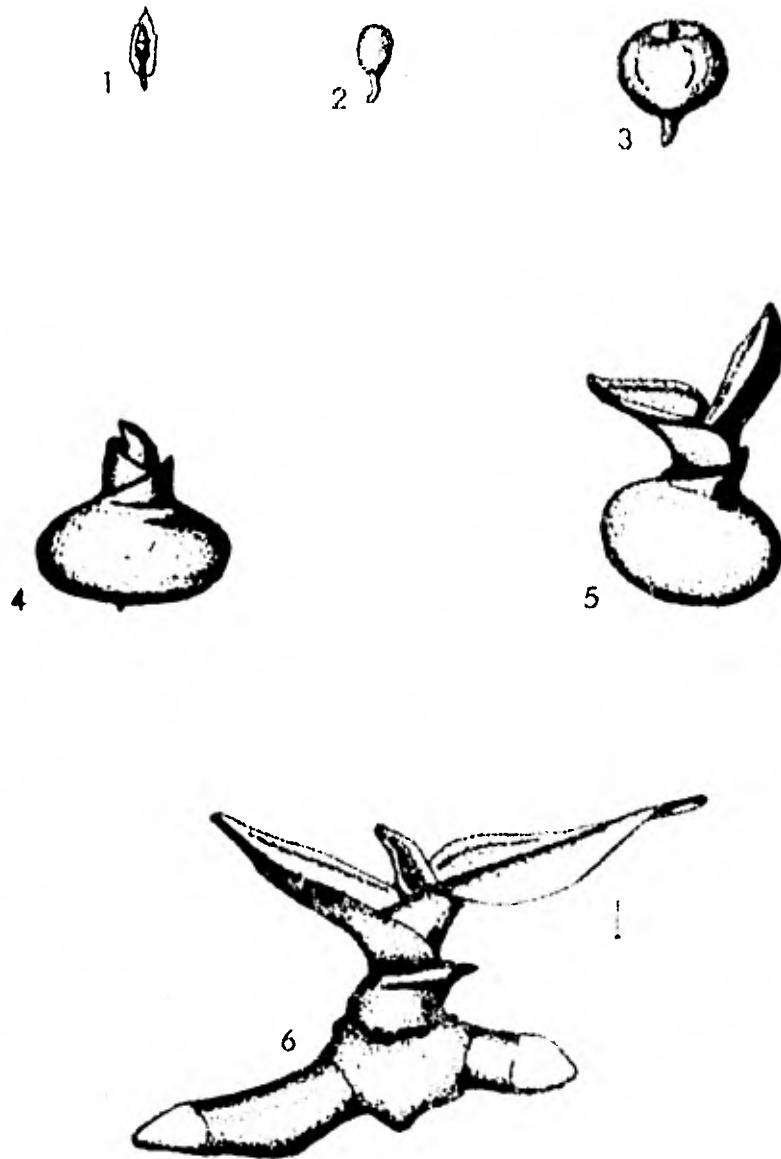


FIGURA 16. DIFERENTES ETAPAS DURANTE LA GERMINACION DE UNA SEMILLA:

1. Embrión cubierto por la testa;
2. Embrión engrosado y sin testa;
3. Protocormo con ápice vegetativo;
4. Protocormo con hojuelas;
5. Plántula con dos hojuelas extendidas;
6. Plántula con hojas y raíces. (4).



FIGURA 17. FASES DE DIFERENCIACION Y CRECIMIENTO A PARTIR DEL CALLO.

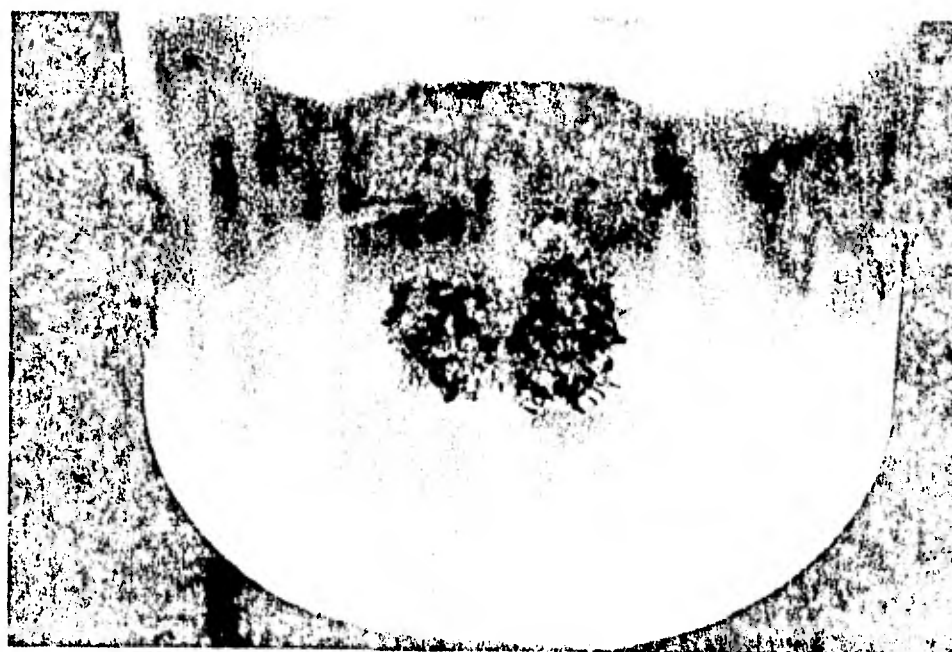


FIGURA 18. BROTES FOLIARES DESARROLLADOS EN FORMA DE RACIMO.



a.



b.

FIGURA 19. PLANTULAS BIEN DESARROLLADAS
a. PLANTULA DE 1 cm DE ALTURA Y
b. PLANTULAS DESDE 1 A 2 cm DE ALTURA
AMBAS CON DOS O MAS HOJAS LANCEOLADAS.

de plántulas, las cuales no estaban bien desarrolladas.

Del análisis para cada una de las variables: número y peso en gramos de las plántulas bien desarrolladas, peso en gramos del callo, protocormos y plántulas no bien desarrolladas, se determinó lo siguiente:

En el número y peso de las plántulas bien desarrolladas existieron diferencias significativas al 5% (Tabla 27) y para realizar las comparaciones múltiples por el método de Tukey para cada variable se tomaron los promedios de cada tratamiento (Tabla 28), determinándose (Tabla 29) que en el tratamiento dos con 0.5 mg/l de BA se obtuvo un promedio de 125.3 plántulas con un peso de 2.2 g siendo éstos diferentes y mayores que todos los demás. Sin embargo, también en los tratamientos uno, seis, nueve y 10 (Tabla 29) se obtuvo un número promedio de plántulas satisfactorio de alrededor de 14 a 20 plántulas.

En el peso de las plántulas no bien desarrolladas también existieron diferencias significativas al 5% (Tabla 30) y a partir de los pesos promedio de cada tratamiento (Tabla 31) se realizaron las comparaciones múltiples, resultando (Tabla 32) ser el tratamiento dos con promedio de 21.53 g de plántulas, diferente estadísticamente y mayor que los demás, los cuales fueron iguales entre sí. Esto coincide con los resultados de las plántulas bien desarrolladas, lo que indica que el tratamiento dos fue el mejor para la obtención de un mayor número de plántulas bien desarrolladas, así como no bien desa

TABLA 27. ANOVA DEL NUMERO Y PESO EN GRAMOS DE LAS PLANTULAS BIEN DESARROLLADAS FORMADAS A LOS 210 DIAS EN EL MEDIO LINSMAIER Y SKOOG.

	<u>F. V.</u>	<u>G. L.</u>	NUMERO		PESO	
			<u>C. M.</u>	<u>F. c.</u>	<u>C. M.</u>	<u>F. c.</u>
TRATAMIENTOS		11	3537.7	12.6 *	1.1	13.7 *
BA		3	4755.0	17.0 *	1.6	20.0 *
ANA		2	3620.1	12.9 *	1.0	12.5 *
BA x ANA		6	2901.6	10.4 *	0.8	10.0 *
E. E.		24	278.7		0.08	
TOTAL		35				

TABLA 28. NUMERO Y PESO EN GRAMOS DE LAS PLANTULAS BIEN DESARROLLADAS FORMADAS A LOS 210 DIAS EN LOS TRATAMIENTOS CONSIDERANDO LA INTERACCION BA x ANA EN EL MEDIO LINSMAIER Y SKOOG.

NUMERO

ANA (mg/l) \ BA (mg/l)	0.0		0.5		1.0		2.0			
	*T	** \bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}
0.0	77	25.6	376	125.3	0	0.0	18	6.0	471	39.2
0.1	9	3.0	57	19.0	14	4.6	31	10.3	111	9.2
0.5	47	15.6	43	14.3	19	6.3	0	0.0	109	9.0
T	133		476		33		49		691	
\bar{x}	14.7		52.8		3.6		5.4		19.1	

PESO

ANA (mg/l) \ BA (mg/l)	0.0		0.5		1.0		2.0			
	*T	** \bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}
0.0	1.2	0.4	6.6	2.2	0.0	0.0	0.4	0.13	8.2	0.6
0.1	0.2	0.06	1.5	0.5	0.3	0.1	0.4	0.13	2.4	0.2
0.5	1.0	0.33	0.6	0.2	0.1	0.03	0.0	0.0	1.7	0.1
T	2.4		8.7		0.4		0.8		12.3	
\bar{x}	0.2		0.9		0.04		0.08		0.3	

*Total
**Promedio

TABLA 29. COMPARACIONES MULTIPLES DE LOS TRATAMIENTOS PARA EL NUMERO Y PESO EN GRAMOS DE PLANTULAS BIEN DESARROLLADAS FORMADAS A LOS 210 DIAS EN EL MEDIO LINSMAIER Y SKOOG.

	<u>NUMERO</u>											
*TRATAMIENTOS	2	1	6	9	10	8	11	4	7	5	3	12
\bar{x}	125.3	25.6	19.0	15.6	14.3	10.3	6.3	6.0	4.6	3.0	0.0	0.0

	<u>PESO</u>											
*TRATAMIENTOS	2	6	1	9	10	4	8	7	5	11	3	12
\bar{x}	2.2	0.5	0.4	0.33	0.2	0.13	0.13	0.1	0.06	0.03	0.0	0.0

* Los tratamientos enunciados se dan el Cuadro 3.

TABLA 30. ANOVA DEL PESO EN GRAMOS DE LAS PLANTULAS NO BIEN DESARROLLADAS FORMADAS A LOS 210 DIAS EN EL MEDIO LINSMAIER Y SKOOG.

<u>F. V.</u>	<u>G. L.</u>	<u>C. M.</u>	<u>F. c.</u>
TRATAMIENTOS	11	100.4	5.5 *
BA	3	105.7	5.8 *
ANA	2	101.0	5.5 *
BA x ANA	6	97.6	5.3 *
E. E.	24	18.2	
TOTAL	35		

TABLA 31. PESO EN GRAMOS DE LAS PLANTULAS NO BIEN DESARROLLADAS FORMADAS A LOS 210 DIAS EN LOS TRATAMIENTOS CONSIDERANDO LA INTERACCION BA x ANA EN EL MEDIO LINSMAIER Y SKOOG.

BA ANA (mg/l) \ (mg/l)	0.0		0.5		1.0		2.0			
	*T	** \bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}
0.0	5.4	1.8	64.6	21.53	0.6	0.2	20.2	6.73	90.8	7.5
0.1	1.6	0.53	3.0	1.0	9.5	3.16	13.4	4.46	27.5	2.2
0.5	5.6	1.86	14.1	4.7	10.6	3.53	3.7	1.23	34.0	2.8
T	12.6		81.7		20.7		37.3		152.3	
\bar{x}	1.4		9.0		2.3		4.1			4.2

*Total
 **Promedio

TABLA 32. COMPARACIONES MULTIPLES DE LOS TRATAMIENTOS PARA EL PESO EN GRAMOS DE LAS PLANTULAS NO BIEN DESARROLLADAS FORMADAS A LOS 210 DIAS EN EL MEDIO LINSMAIER Y SKOOG.

*TRATAMIENTOS	2	4	10	8	11	7	9	1	12	6	5	3
\bar{x}	21.53	6.73	4.7	4.46	3.53	3.16	1.86	1.8	1.23	1.0	0.53	0.2

*Los tratamientos enunciados se dan en el Cuadro 3.

rrollados pero que en algún momento podran obtener las características de aquellas.

A pesar de que no hubo ninguna diferencia significativa al 5% entre los tratamientos para la formación de protocormos y callo (Tabla 33), se puede observar en la tabla 34 que el mayor peso promedio de callo, de 14.16 g , se obtuvo en el tratamiento cuatro con únicamente 2.0 mg/l de BA. Este tratamiento fue seguido por el dos, con 0.5 mg/l de BA, donde se obtuvo 8.63 g de callo, el cual a su vez tuvo la mayor productividad en los dos tipos de plántulas (Tablas 29 y 32).

Durante esta inducción o la diferenciación se confirmó una vez más, que el uso de 0.5 mg/l de BA es útil para la proliferación y mantenimiento del callo, el cual a su vez proporcionó una gran producción de plántulas, tanto bien desarrolladas como no bien desarrolladas y protocormos.

c. Enraizamiento

Después de 75 días en cultivo, las plántulas en el tratamiento siete (Figura 20) presentaron un 100% de enraizamiento, obteniéndose un número promedio de 3.1 raíces por plántula (Figura 21), el cual fue mayor que en el resto de los tratamientos mientras que en el tratamiento tres no hubo formación de raíces (Figuras 20 y 21).

El tratamiento uno con carencia de hormonas y el tratamiento dos con únicamente 1.0 mg/l de ANA tuvieron 15% de plántulas enraizadas (Figura 20), sin embargo el número prome

TABLA 33. ANOVA DEL PESO EN GRAMOS DE LOS PROTOCORMOS Y DEL CALLO FORMADOS A LOS 210 DIAS EN EL MEDIO LINSMAIER Y SKOOG.

<u>F. V.</u>	<u>G. L.</u>	<u>PROTOCORMOS</u>		<u>CALLO</u>	
		<u>C. M.</u>	<u>F. c.</u>	<u>C. M.</u>	<u>F. c.</u>
TRATAMIENTOS	11	23.0	1.2	66.7	1.5
BA	3	32.7	1.8	52.0	1.1
ANA	2	15.0	0.84	94.6	2.15
BA x ANA	6	20.9	1.1	64.7	1.4
E. E.	24	17.7		44.0	
TOTAL	35				

TABLA 34. PESO EN GRAMOS DE LOS PROTOCORMOS Y DEL CALLO FORMADOS A LOS 210 DIAS EN LOS TRATAMIENTOS CONSIDERANDO LA INTERACCION BA x ANA EN EL MEDIO LINSMAIER Y SKOOG.

PROTOCORMOS

ANA (mg/l) \ BA (mg/l)	0.0		0.5		1.0		2.0			
	*T	** \bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}
0.0	0.0	0.0	8.2	2.73	13.8	4.6	15.9	5.3	37.9	3.1
0.1	2.0	0.66	1.6	0.53	27.0	9.0	0.0	0.0	30.6	2.5
0.5	0.0	0.0	6.1	2.03	2.5	0.83	3.3	1.1	11.9	1.1
T	2.0		15.9		43.3		19.2		80.4	
\bar{x}	0.2		1.7		4.8		2.1		2.2	

CALLO

ANA (mg/l) \ BA (mg/l)	0.0		0.5		1.0		2.0			
	*T	** \bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}	T	\bar{x}
0.0	0.0	0.0	25.9	8.63	8.6	2.88	42.5	14.16	77.0	6.4
0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	25.1	8.36	2.5	0.83	27.6	2.3
0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	12.6	4.2	0.0	0.0	12.6	1.05
T	0.0		25.9		46.3		45.0		117.2	
\bar{x}	0.0		2.8		5.1		5.0		3.2	

*Total
**Promedio

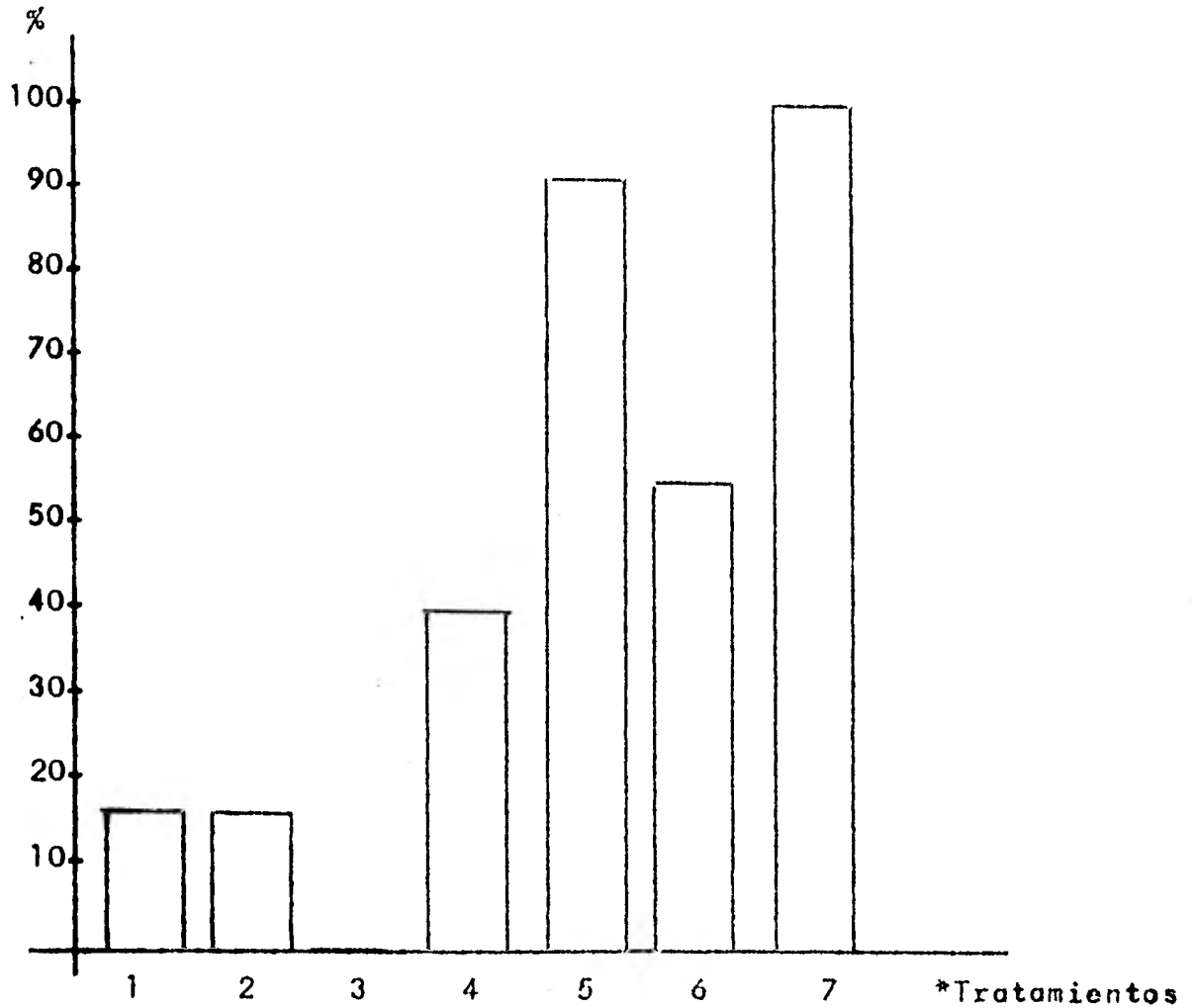


FIGURA 20. PORCENTAJE DE PLANTULAS ENRAIZADAS EN
CADA TRATAMIENTO EN EL MEDIO
LINSMAIER Y SKOOG.

*Los tratamientos enunciados se dan en en el Cuadro 4.

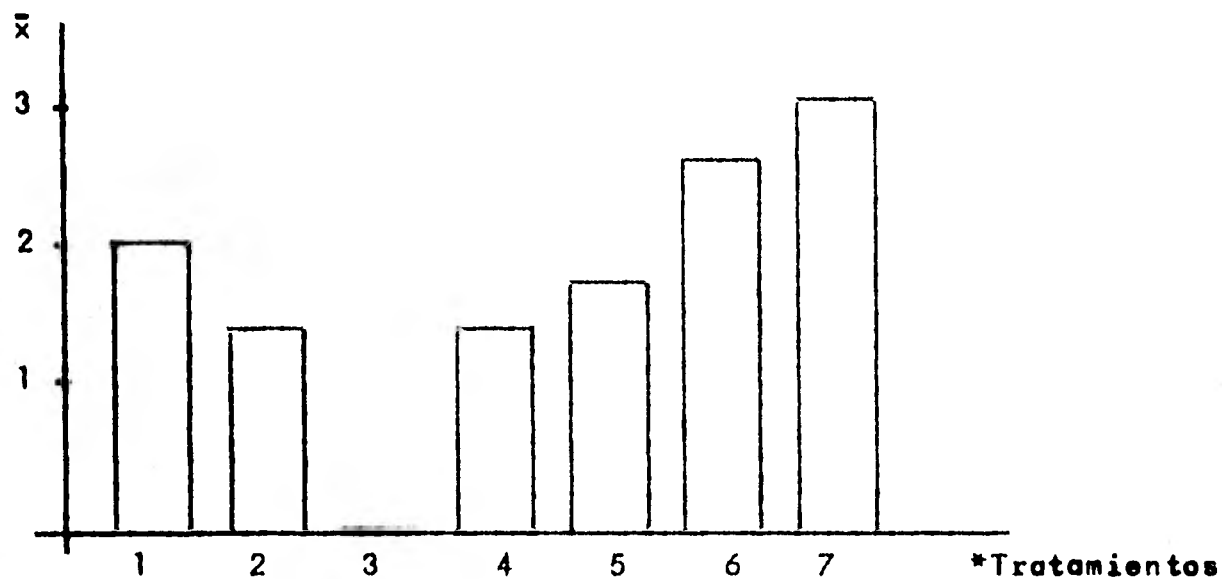


FIGURA 21. PROMEDIO DEL NUMERO DE RAICES OBTENIDAS POR PLANTULA EN CADA TRATAMIENTO EN EL MEDIO LINSMAIER Y SKOOG.

* Los tratamientos enunciados se dan en el Cuadro 4.

dio de raíces por plántula en el tratamiento uno fue de 2 mientras que en el tratamiento dos fue de 1.33 (Figura 21).

En la figura 20 podemos apreciar que el tratamiento cinco tuvo un 90% de plántulas enraizadas y el tratamiento seis un 55%; pero podemos apreciar en la figura 21 que en este último tratamiento el número promedio de raíces por plántula fue de 2.63, mientras que en el tratamiento cinco fue de 1.72. Para darnos una idea más exacta del número promedio de raíces por plántula en los tratamientos cinco, seis y siete, consideramos el intervalo de valores de cada promedio estableciendo su intervalo de confianza con una probabilidad del 1% (12), determinándose en la tabla 35 que el intervalo de confianza fue mayor en el tratamiento siete seguido por los tratamientos seis y cinco.

Estos resultados confirmaron que las auxinas son hormonas que intervienen en la formación de raíces, además de ser esenciales para la elongación radicular (22, 23, 28, 43) (Figura 22). Sin embargo en este caso el IBA en concentraciones mayores que el ANA fue más efectivo para dicha formación y elongación (5, 52), ya que al ir empleando únicamente concentraciones mayores de ANA, éste ejercía un efecto inhibitorio para la inducción radicular (Figura 20).

Cabe mencionar que después de los primeros 15 días en cultivo en todos los tratamientos, excepto en el tratamiento tres, los primeros indicios de formación de raíces se observaron como pequeños "puntos de crecimiento" de color verde pálido

TABLA 35. INTERVALO DE VALORES PARA EL NUMERO PROMEDIO DE RAICES POR PLANTULA EN LOS TRATAMIENTOS 5, 6 Y 7 EMPLEANDO EL INTERVALO DE CONFIANZA CON UN NIVEL DE SIGNIFICANCIA DEL 1%.

*TRATAMIENTOS	INTERVALO DE CONFIANZA
5	1.72 ± 0.49 , 1.23 - 2.21
6	2.63 ± 1.39 , 1.24 - 4.02
7	3.1 ± 0.97 , 2.13 - 4.07

*Los tratamientos enunciados se dan en el Cuadro 4.

do, los cuales se originaron en cualquier punto del tallo y no precisamente en la base (37) (Figura 22).

En estas pequeñas raíces, al irse elongando, se formó una cubierta de color blanquecino verdoso constituyendo el llamado velamen, característico de las raíces de orquídeas epífitas, ya que les facilita la absorción del agua y sales minerales (37). La punta de las raíces presentaban un color verde, que es característica importante de las raíces aéreas que pueden ser total o parcialmente clorofílicas y por lo tanto cumplir funciones fotosintéticas (11, 37, 52) (Figura 23).

Otra característica, que es importante señalar, es que el crecimiento de las raíces fue hacia los lados principalmente, presentando en estos casos geotropismo negativo (52).

d. Adaptación

Cuando las plántulas estuvieron formadas completamente, con más de tres raíces de 1 a 2 cm de longitud, se traspasa--ron a los seis diferentes sustratos (Cuadro 5), los que ini--cialmente se colocaron en cajas de madera, sin embargo éstas no fueron útiles ya que la constante proliferación de hongos sobre las paredes de estos recipientes y en la superficie de los sustratos provocaron la muerte de las plántulas; por lo que se emplearon recipientes de plástico los cuales dieron mejores resultados.

En la figura 24 se puede observar que la mayoría de las plántulas se adaptaron en los sustratos donde se empleó maqui

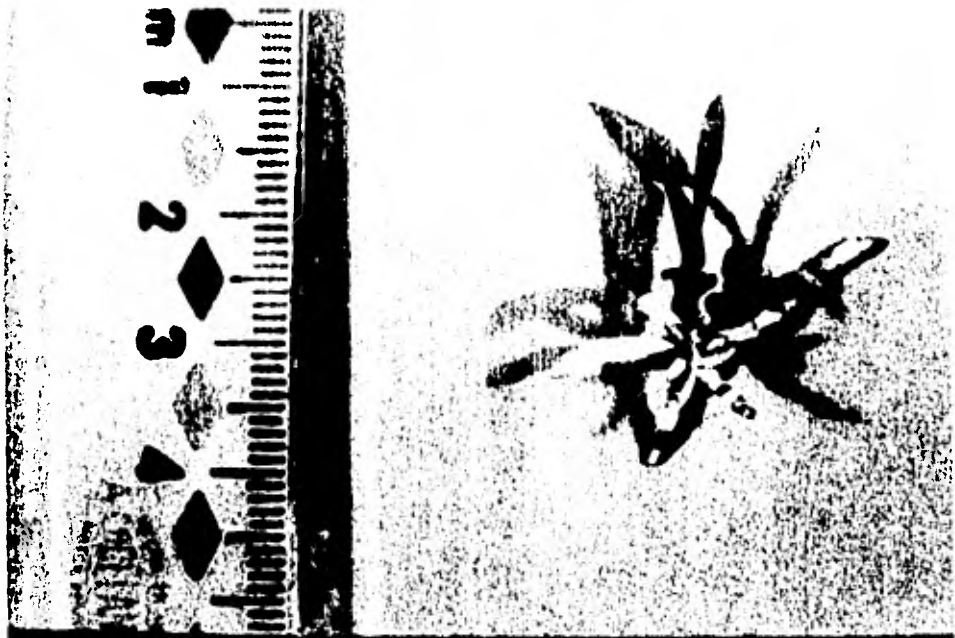


FIGURA 22. FORMACION DE RAICES COMO PEQUEÑOS
"PUNTOS DE CRECIMIENTO".

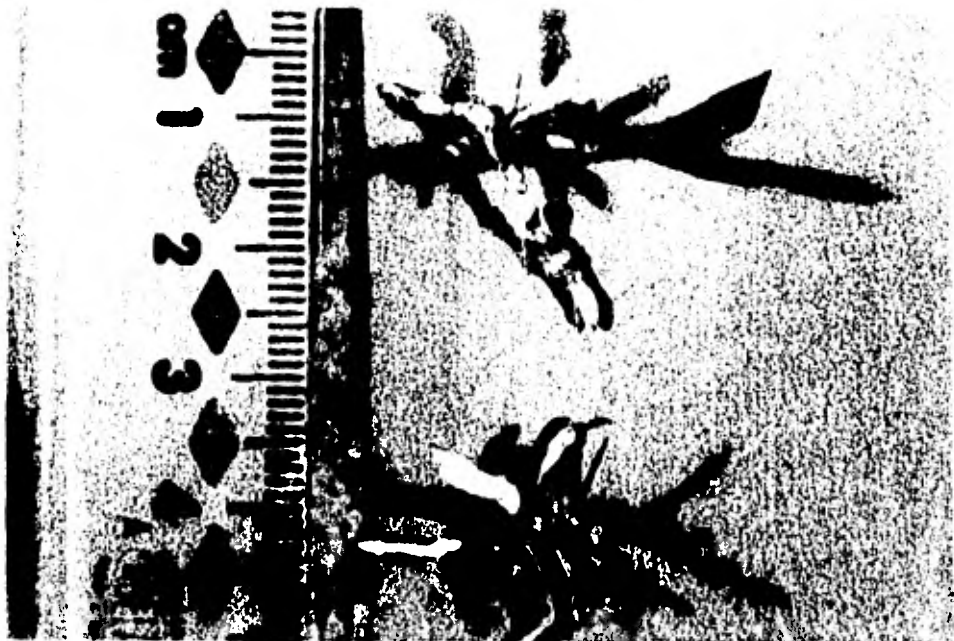


FIGURA 23. RAICES TÍPICAS DE UNA ORQUÍDEA EPIFITA.

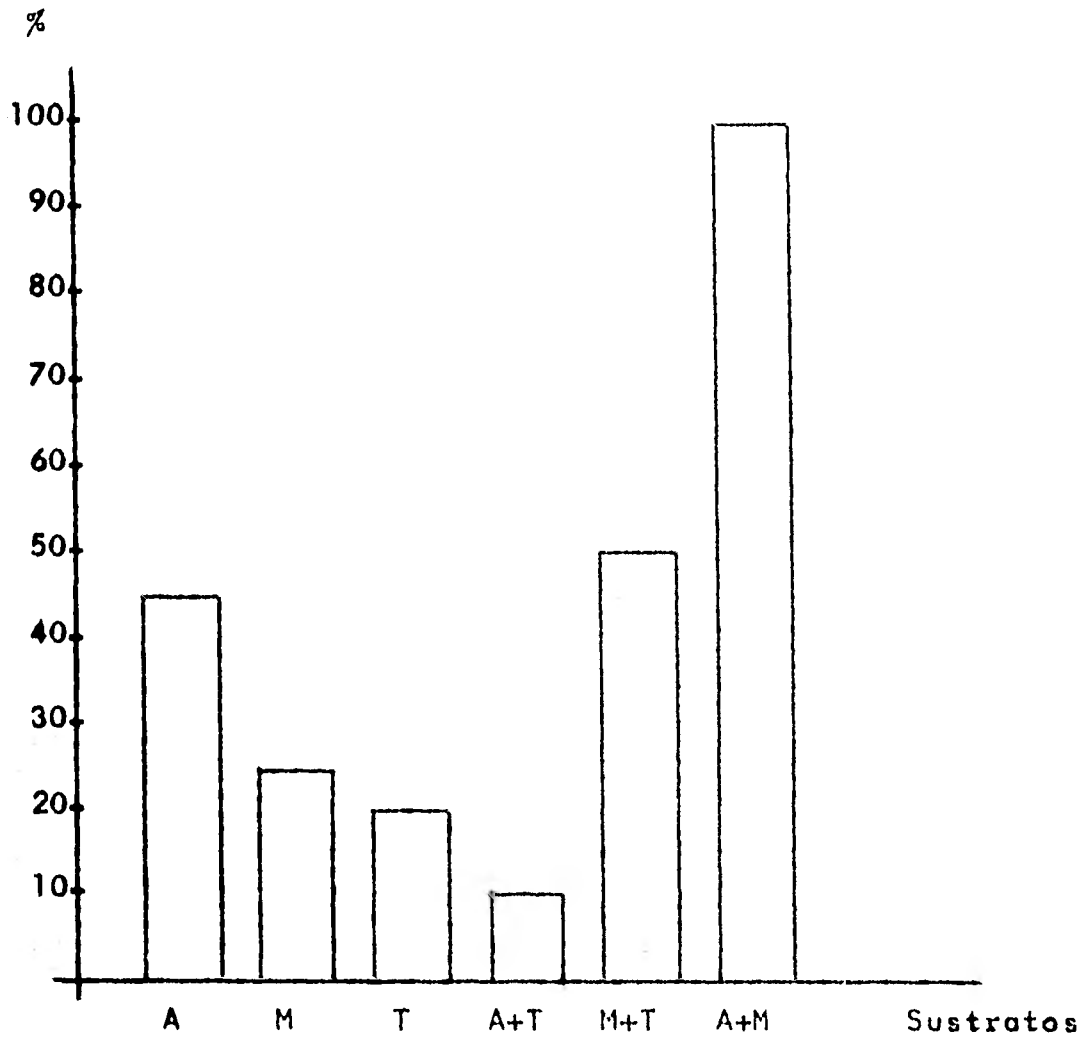


FIGURA 24. PORCENTAJE DE PLANTULAS ADAPTADAS EN CADA UNO DE LOS SUSTRATOS EMPLEADOS.

que principalmente y agrolita; resultando un 100% de adaptación en la mezcla de agrolita y maquique (Figura 24 y 25) y un 50% de adaptación en la mezcla de maquique y turba (Figuras 24 y 26), mientras que con la mezcla de agrolita y turba se obtuvo el menor porcentaje de adaptación (Figura 24).

La turba es un tipo de suelo que retiene mucha humedad, tiene un pH alrededor de 3.5, además de contener sustancias fungistáticas que inhiben el ahogamiento de las plántulas que se desarrollan en él (20). Sin embargo en este sustrato y en la mezcla con agrolita se presentó una mayor proliferación de hongos saprófitos que en el resto de los sustratos; para evitar la proliferación de éstos, se aplicó periódicamente solución fungicida de Promyl (2), pero las plántulas presentaron a los 30 días aproximadamente pudrición en su parte basal y en las raíces, provocándoles la muerte. Esto pudo deberse a que con el riego el pH de la turba variara, permitiendo con mayor facilidad la proliferación de los hongos en el sustrato con exceso de humedad.

Las plántulas en el resto de los sustratos fueron fertilizadas con una solución mineral de Linsmaier y Skoog una vez por semana, sin embargo las plántulas en agrolita requirieron de mayor humedad, ya que este sustrato permitió una mayor filtración y por lo tanto una mayor pérdida de agua.

El maquique es uno de los sustratos mayormente empleados para el cultivo de orquídeas, sin embargo resultó mejor mezclado con agrolita, pues ésta permitió una mayor filtración



FIGURA 25. PLANTULAS EN LA MEZCLA DE AGROLITA Y HARBOQUE.

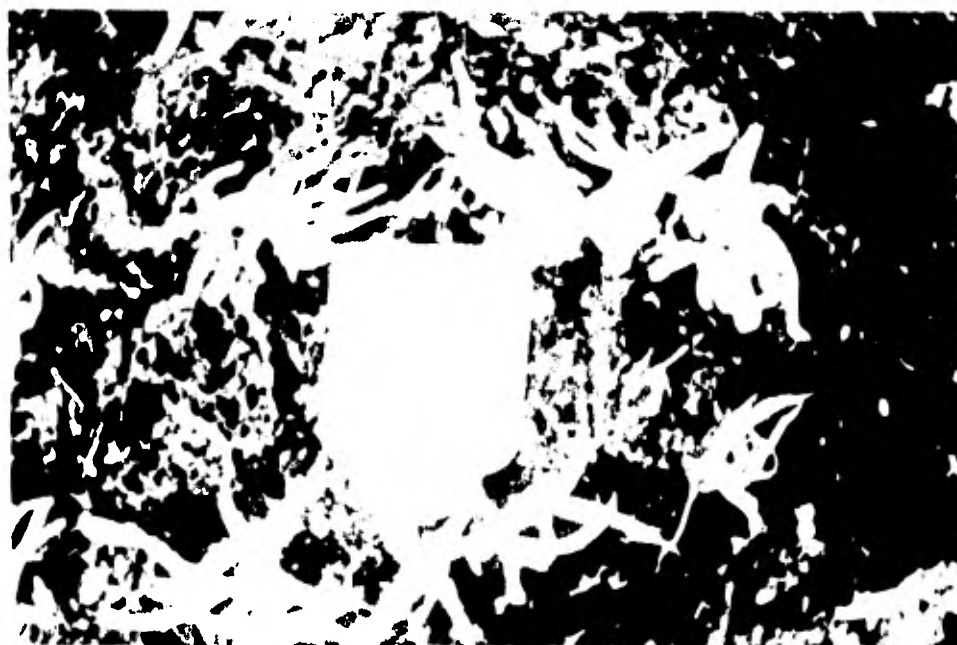


FIGURA 26. PLANTULAS EN LA MEZCLA DE HARBOQUE Y TURCA.

del agua y a su vez una mayor aereación para las raíces de las plántulas.

Las plántulas adaptadas al medio ambiente presentan una buena apariencia, aún cuando su desarrollo no se ha incrementado mucho y lo único que resta por hacer es continuar su cultivo y esperar su floración.

CONCLUSIONES

- La utilización del callo derivado de las plántulas, provenientes de semillas de Laelia anceps var. alba germinadas "in vitro", fue el material idóneo para el establecimiento del cultivo, ya que a partir de éste se logró obtener gran cantidad de tejido útil mediante su constante proliferación, además de emplear parte de éste, para su inducción a la organogénesis y formar finalmente plántulas completas.

- Los dos factores principales que determinaron las diferentes respuestas en el callo de L. anceps var. alba fueron:
 1. El medio nutritivo.
 2. El balance hormonal entre auxinas y citocinina.

- La comparación de los tres medios nutritivos permitió determinar que el medio de Linsmaier y Skoog fue el mejor para la proliferación y mantenimiento del callo, donde la concentración total de sales minerales fue mayor que en los dos restantes; además de que el suplemento de tiamina como única vitamina, al parecer, fue determinante para una mayor proliferación del callo. Siendo este mismo medio satisfactorio para la inducción a la organogénesis del tejido.

- La preparación correcta de los medios de cultivo es determinante para el adecuado crecimiento del tejido, pues el mínimo error durante su preparación puede afectar el de-

sarrollo del tejido en cultivo.

- El mayor peso fresco total de callo se obtuvo en el tratamiento de 1.6 mg/l de ANA con 1.0 mg/l de BA en el medio Linsmaier y Skaog; como también en la mayoría de los tratamientos donde se emplearon únicamente concentraciones de BA o al interactuar éstas con 0.1 y 1.6 mg/l de ANA, pero dependiendo principalmente de una mayor concentración de auxina (ANA) que de citocinina (BA).
- Se obtuvo en un periodo de siete meses un total de 376 plántulas a partir de \pm 1.5 g de callo en el medio Linsmaier y Skaog, con 0.5 mg/l de BA. La formación de plántulas en el tratamiento sin adición hormonal fue posible, aún cuando los primeros indicios de morfogénesis fueron más lentas que en aquellos tratamientos suplementados con hormonas.
- El uso de auxinas (ANA/IBA) fue determinante para la formación de un sistema radicular esencial para este tipo de plántulas, en un lapso de dos meses y medio.
- La combinación de maquique y agrolita como sustrato ofreció las mejores condiciones para la adaptación de las plántulas al medio ambiente, ya que ésta es la etapa más crítica para dichas plántulas para establecerse aquí su autotrofismo.
- Como se puede observar, la aplicación del método de cultivo de tejidos "in vitro" proporciona una gran ayuda para la propagación de Laelia anceps var. alba, produciendo

gran cantidad de plántulas completas en un período de 10 me ses aproximadamente, concluyendo con la etapa de adaptación de aproximadamente dos meses.

- De acuerdo con los objetivos planteados al inicio del presente trabajo, se puede concluir que éstos se realizaron en su totalidad.

RECOMENDACIONES

- Es conveniente realizar resiembras lo más frecuente posible, es decir, si la superficie del medio de cultivo es ta saturado por tejido, es conveniente trasplantarlo a medio fresco para evitar la acumulación de desechos metabólicos que pueden ser tóxicos en el medio e inhiben el crecimiento del tejido en cultivo.

- Un método rápido, seguro y factible para poder conser var las especies amenazadas con la extinción, es la realizaci ón de una propagación masiva, mediante este método, para restituir las a su medio natural o bien incrementando la construcción de jardines botánicos para su conservación.

BIBLIOGRAFIA

Citada

1. Abbot, A.J., 1978. Practice and promise of micropropagation of woody species. Acta Hort. 79: 113-127.
2. Agrichemicals label manual, 1975. E.I. DuPont de Nemours & Co. (Inc.) Biochemicals Department. Wilmington, Delaware.
3. Aitchison, P.A., A.J. Macleod and M.M. Yeoman, 1977. Growth patterns in Tissue (callus) cultures. En: Plant Tissue and Cell Culture. Ed. by H.E. Street. Univ. Cal. Press. U.S.A.: 267-306.
4. Arditti, J., 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. Bot. Rev. 33 (1): 1-97.
5. -----, 1977. Clonal propagation of orchids by means of tissue culture - A manual. En: Orchid Biology. Ed. by J. Arditti. Cornell Univ. Press. N.Y., U.S.A.: 203-289.
6. Arditti, J. and M.S. Strauss, 1979. Taro tissue culture manual. Noumea, New Caledonia: 59p.p.
7. Azaola, A., 1979. Papel de los reguladores del crecimiento vegetal en el cultivo de tejidos "in vitro". Tesis profesional, Fac. Química, U.N.A.M. México: 140p.p.
8. Barba, A.A., 1981. Propagación vegetativa "in vitro" de los portainjertos EM-26 y MM-106 del manzano (Malus sylvestris Mill). Tesis profesional. Biología, U.N.A.M. México: 97p.p.
9. Bertsch, PH. D., 1967. A new frontier - Orchid Propagation by meristem tissue culture. Am. Orch. Soc. Bull. 36: 32-38.
10. Boodley, J.W., 1981. The commercial greenhouse handbook. Ed. Von Nostrand Reinhold Co. N.Y., U.S.A.: 472-488.
11. Caneva, S., 1978. Orquídeas. Ed. Albatros. B.A., Argentina: 230p.p.

12. Cañedo, L.C., et al, 1980. Principios de investigación médica. Impresiones Modernas. México: 435p.p.
13. Chavez, E., 1980. Comunicación Personal.
14. Churchill, M.E., et al, 1971. Clonal propagation of orchids from leaf tips. Am. Orch. Soc. Bull. 40: 109-113.
15. -----, 1972. Tissue Culture of Orchids - II. Methods for root tips. Am. Orch. Soc. Bull. 41: 726-730.
16. García, M.E., 1978. Apuntes de Climatología. 2a. ed. México: 153p.p.
17. García, R.P. y M. Peña, 1981. Uso de los orquídeas en México desde la época prehispánica hasta nuestros días. Orquídea (Mex.) 8 (1): 59-75.
18. Hartmann, W.L., 1971. Introducción al cultivo de las orquídeas. Ed. Fournier, S.A. México: 109p.p.
19. -----, 1981. Las orquídeas de Chiapas en peligro de desaparecer. Consejo Protector de la Naturaleza del Gobierno del estado de Chiapas. (No publicado).
20. Hartmann, H.T. y D.E. Kester, 1980. Propagación de Plantas. Ed. Continental. México. 2a. ed.: 814p.p.
21. Hawkes, A.D., 1965. Encyclopaedia of Cultivated Orchids. Faber & Faber Limited. London: 256-257.
22. Hernández, L.P., 1981. Propagación masivo "in vitro" de dos cultivares de Violeta Africana (Saintpaulia ionantha, Wendl.). Tesis Profesional. Biología, U.N.A.M. México: 79p.p.
23. Hess, D., 1980. Fisiología Vegetal. Ed. Omega, Barcelona, España: 388p.p.
24. Ikeda, M., et al, 1976. The thiamine requirement for callus formation from soybean hypocotyl. Plant Cell Physiol. 17: 1097-1098.
25. Kramer, J., 1977. How to grow Orchids. Lane Publishing

- Co. Cal., U.S.A.: 64p.p.
26. Kohl, H.C., Jr., 1962. Notes on the development of Cymbidium from seed to plantlet. Am. Orch. Soc. Bull. 31: 117-120.
 27. Levitt, J., 1974. Introduction to plant physiology. Mosby Co. St. Louis, U.S.A.: 447p.p.
 28. Leopold, A.C. and P.E. Kriedemann, 1975. Plant Growth and Development. McGraw Hill Co. U.S.A. 2a. ed.: 545p.p.
 29. Marín, C.A., 1945. La Floricultura Mexicana. Tesis de Licenciatura. E.N.A. Chapingo. México.
 30. Miller, I. and J.E. Freund, 1965. Probability and Statistics for Engineers. Prentice-Hall. U.S.A.: 269 p.p.
 31. Morel, G.M., 1960. Producing virus-free Cymbidiums. Am. Orch. Soc. Bull. 29: 495-497.
 32. -----, 1964. Tissue Culture - A new means of clonal propagation of orchids. Am. Orch. Soc. Bull. 33: 473-478.
 33. -----, 1974. Clonal Multiplication of Orchids. En: The Orchids. Ed. by Withner. Wiley & Sons, U.S.A.: 169-222.
 34. Murashige, T., 1974. Plant Propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant. Physiol. 25: 135-166.
 35. Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
 36. Narayanaswamy, S., 1977. Regeneration of plant from tissue culture. En: Plant Cell, Tissue, and Organ Culture. Ed. by J. Reinert and Y.P.S. Bajaj. Springer-Verlag. N.Y., U.S.A.: 179-206.
 37. Orquídeas, 1979. Publicado por el Museo Nal. de Costa Rica. Depto. de Historia Natural: 36 p.p.
 38. Rao, A.N., 1977. Tissue Culture in the Orchid Industry. En: Plant Cell, Tissue, and Organ Culture. Ed. by Reinert and Y.P.S. Bajaj.

Springer-Verlag. N.Y., U.S.A.: 44-69.

39. Reinikka, M.A., 1972. A history of the orchid. Coral Gables. Fla. Univ. of Miami Press: 316p.p.
40. Robbins, W.W., 1976. Botánica. Ed. Limusa. México: 608p.p.
41. Rojas, G.M., 1972. Fisiología Vegetal Aplicada. McGraw Hill Co. U.S.A. 2a. ed.: 262p.p.
42. Sagawa, Y., et al, 1966. Clonal propagation of Cymbidium through shoot meristem culture. Am. Orch. Soc. Bull. 35: 118-122.
43. Salisbury, B. and C. Ross, 1978. Plant Physiology. Wadsworth Publ. Co. N.Y., U.S.A.: 422 p.p.
44. Scagel, R.F., 1977. El Reino Vegetal. Ed. Omega. Barcelona, España: 659p.p.
45. Schultes, R.R. and A.S. Pease, 1963. Generic names of orchids. Their origin and meaning. Academic Press. N.Y., U.S.A.: 26, 27 y 173.
46. Scully, R.M., Jr., 1967. Aspects of meristem culture in the Cattleya alliance. Am. Orch. Soc. Bull. 36: 103-108.
47. Sheehan, T.J., 1980. Introduction to Floriculture. Ed. by Ray A. Larson. Academic Press. U.S.A.: 133-165.
48. Solis, O., 1927. Orquídeas Mexicanas.
49. Stewart, D.C., 1978. Native Orchids of North America and North of Mexico. Stanford Univ. Press. Stanford Cal., U.S.A.: 399p.p.
50. Thorpe, T.A., 1977. Carbohydrate metabolism and shoot formation in tobacco callus. Med. Fac. Landboww Rej Ksunw Gent. 42(2): 1681-1689.
51. Vacherot, M., 1966. Meristem tissue culture propagation of orchids. En: Proceedings of the fifth World Orchid Conference. Ed. Garmo. U.S.A.: 23-26.
52. Vajrabhaya, T., 1977. Tissue culture - Somatic cell genetics. En: Orchid Biology. Ed. by

J. Arditti. Cornell Univ. Press.
U.S.A.: 177-201.

53. Wilfret, G.J., 1966. Formation of protocorm like bodies on excised Cymbidium shoot tips. Am. Orchid. Soc. Bull. 35: 823-827.
54. Williams, L.O., 1965. The Orchidaceae of Mexico. Ed. by Abdul Bari Awan. Escuela Agricola Panamericana. Tegucigalpa, Honduras. A.C.
55. Wright, N.P., 1958. Orquídeas de México. Ed. Fournier, S.A. México: 23p.p.
56. Yeoman, M.M. and A.J. Macleod, 1977. Tissue (callus) cultures - Techniques. En: Plant Tissue and Cell Culture. Ed. by H.E. Street. Univ. Cal. Press. Berkeley, U.S.A.: 31-59.
57. Yeoman, M.M. and H.E. Street, 1977. General cytology of cultured cells. En: Plant Tissue and Cell Culture. Ed. by H.E. Street. Univ. Cal. Press. Berkeley, U.S.A.: 137-176.
58. Zuccherelli, G., 1979. Multiplicazione in vitro del portainnesti clonali del pesco. Frotticoltura. 41(2): 15-20.

Consultada

1. Jones, R.W., 1943. Orchids for Beginners. Am. Orch. Soc. Bull. 12: 235-236.
2. Street, H.E., 1977. Introduction. En: Plant Tissue and Cell Culture. Ed. by H.E. Street. Univ. Cal. Press. Berkeley, U.S.A.: 31-59.
3. Wimber, D.E., 1963. Clonal multiplication of Cymbidiums through tissue culture of shoot meristem. Am. Orch. Soc. Bull. 32: 105-107.