

00361

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PROPAGACION MASIVA IN VITRO Y RECUPERACION DE POBLACIONES DE ORQUIDEAS EN PELIGRO DE EXTINCION.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA)
P R E S E N T A I
ALEJANDRO MARTINEZ PALACIOS



MEXICO, D. F.

HECHO CON
FALLA DE ORIGEN

1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

INDICE

RESUMEN

I.	INTRODUCCION	1
	I.1 Biodiversidad y destrucción de los ecosistemas Naturales.	1
	I.2 Situación de la diversidad vegetal en México.	4
	I.3 Posibles soluciones para la Conservación de nuestros ecosistemas.	6
	I.4 Libro rojo (IUCN) de las especies vegetales amenazadas en la naturaleza.	13
	I.5 Tratados sobre Conservación a nivel Internacional.	14
	I.6 Conservación de especies vegetales.	19
II.	ANTECEDENTES	26
	II.1 Diversidad de las orquídeas.	26
	II.2 Importancia de las orquídeas.	26
	II.3 Semillas de orquídeas y la historia de su germinación.	27
	II.4 Propagación clonal.	30
	II.5 Propagación masiva a partir de tejidos somáticos no meristemáticos.	30
	II.6 Análisis poblacional	30
	II.7 Aplicación industrial	32
	II.8 Avances de investigación in vitro de algunas especies de orquídeas amenazadas.	33
III.	OBJETIVOS	34
IV.	MATERIALES Y METODOS	37
	IV.1 Material biológico.	37
	IV.2 Medios nutritivos para el cultivo <u>in vitro</u> de orquídeas.	38
	IV.3 Procedimiento de siembra en condiciones de asepsia.	41
	IV.4 Siembra y subcultivo de semillas y otros explantes.	42
	IV.5 Métodos estadísticos.	45
	IV.6 Condiciones de incubación.	45
	IV.7 Aclimatación de plantas en condiciones de invernadero.	46
	IV.8 Reintroducción de plantas en los habitats naturales.	47
V.	RESULTADOS Y DISCUSION	48
	V.1 Germinación asimbiótica de semillas de <u>Lycaste skinneri</u> (Batem. ex Lindl.) Lindl. var. <u>skinneri</u> .	49
	V.2 Efecto de los reguladores del crecimiento en la germinación de semillas de <u>L. skinneri</u> var. <u>skinneri</u> .	50
	V.3 Enriquecimiento del medio basal Knudson "C" (KC).	51
	V.4 Tiempo de germinación de las semillas de <u>L. skinneri</u> var. <u>skinneri</u> .	53
	V.5 Condiciones de luz.	53
	V.6 Germinación asimbiótica de semillas de orquídeas en	

medio KC-E.	54
V.7 Propagación masiva de <u>Oncidium stramineum</u> (Lindl.) Batem. a partir de protocormos cultivados en medio líquido.	57
V.8 Efecto de los reguladores del crecimiento y el pH en el desarrollo de brotes de <u>Bletia urbana</u> Dressler.	60
V.9 Efecto de compuestos orgánicos en el desarrollo de plántulas de <u>L. skinneri</u> var. <u>skinneri</u> .	65
V.10 Aclimatación de las plantas de condiciones <u>in vitro</u> a invernadero.	70
V.11 Liberación y sobrevivencia de las plantas en el hábitat natural.	71
V.12 Consideraciones finales.	77
V.13 Recomendaciones del conocimiento adquirido a través de la experiencia.	79
VI. CONCLUSIONES.	83
VII. LITERATURA CITADA.	90

RESUMEN

La vegetación de México está siendo aceleradamente perturbada, ocasionando en una gran mayoría de especies una erosión genética, lo cual presagia de continuar este efecto devastador, la extinción de muchas de las especies. Un ejemplo sobre la disminución de las poblaciones se presenta en la familia Orchidaceae (Orquídeas), agudizándose en las de distribución restringida o endémicas y en la mayoría de hábito epífita y algunas terrestres que dependen de la vegetación arbórea para subsistir, la que se ha estado sustituyendo por pastizales y campos agrícolas.

La utilización de las técnicas Biotecnológicas de Cultivo de Tejidos Vegetales, han sido fundamentales para propagar orquídeas mexicanas con diferentes status de alteración, debido a su dificultad en los métodos de propagación por semilla o vegetativamente. Ambos casos podrían tomar varios años de propagación. Además, en especies amenazadas de extinción, se cuenta por lo general con escaso material biológico de campo.

Después de la utilización de varios medios basales y modificados para establecer el mejor porcentaje de germinación, se eligió el medio Knudson "C" (KC) enriquecido con vitaminas y micronutrientes (KC-E), el cual permitió 100% de germinación asimbiótica de Lycaste skinneri (Batem. ex Lindl.) Lindl. var. skinneri. El medio KC-E fue utilizado posteriormente para la germinación de más de 10 especies. Se desarrollaron sistemas de propagación masiva con la formación de PLB's, a partir del cultivo en medios líquidos en suspensión de protocormos sexuales

(semillas germinadas) de Oncidium stramineum (Lindl.) Batem., generando un promedio de 50 brotes por protocormo.

Para el desarrollo de plantas in vitro, se sujetaron brotes de Bletia urbana Dressler, bajo un barrido hormonal auxina-citocinina-giberelina, las concentraciones usadas actuaron inhibitoriamente o desarrollaron plantas anormales en comparación del medio basal (KC), Por lo anterior, se exploró el desarrollo de plantas (30 mm) de L. skinneri var. skinneri germinadas in vitro, utilizando el medio KC con los micronutrientes del medio KC-E, adicionándole vitaminas+glutamina o extractos orgánicos (plátano o agua de coco o tallos de nopal). El mejor desarrollo de las plantas in vitro, se obtuvo cuando el medio presentaba extracto de plátano verde o nopal.

Las plantas con los mayores avances en la investigación in vitro, fueron Lycaste aromatica (Graham ex Hooker) Lindl., L. skinneri var. skinneri y O. stramineum. Las dos primeras por presentar hábito epífita con adaptación al terrestre se transplantaron, aclimataron y desarrollaron por 3 meses en condiciones de invernadero, en charolas con una mezcla 1:1 de hoja de encino y agrolita. Posteriormente fueron liberadas en los "Lagos de Montebello" Chiapas. Para O. stramineum de hábito epífita, se dificultó su adaptación en invernadero, por ahogamiento de las raíces, por lo anterior se liberó directamente de condiciones in vitro al campo (habitat natural Huatusco Ver.), no sin antes sujetarlas a un stress (alta intensidad de luz (3 a 4 mil lux), y bajo en humedad y nutrimentos) en condiciones in vitro.

En las 3 especies, aunque disminuyeron las poblaciones liberadas, un porcentaje ha sobrevivido y se ha adaptado al ambiente silvestre.

I. INTRODUCCION

I.1 Biodiversidad y destrucción de los ecosistemas Naturales.

Desde hace 10 mil años, la diversidad biológica entró a una nueva era en la turbulenta historia de la vida del planeta. La actividad humana ha tenido un efecto devastador sobre la diversidad de las especies, y la proporción de sus efectos es acelerada sobre la inducción de la extinción de distintas formas de vida (Wilson, 1985, 1989).

Este hecho es particularmente dramático en los bosques tropicales. La Comisión Mundial sobre Desarrollo y Medio Ambiente, ha indicado que cada año se realizan desmontes en estos ecosistemas de 7.6 a 10 millones de hectáreas (Wilson, 1985, 1989), lo cual es probable que se incremente si no se establecen medidas conservacionistas. Esta alteración de los ecosistemas repercute en las especies biológicas estimadas en 1.4 millones, de las cuales se registran 248,428 de plantas vasculares (Wilson, 1989; Wolf, 1988). Actualmente 1 a 2 especies vegetales desaparecen cada día. A principios de 1980 se estimaba que el 20% de las especies conocidas estaban amenazadas de extinción (C.I.T.E.S., 1987). Se ha calculado que un 7% de estas se extinguirán a fines del siglo (Repetto, 1990). Estos datos de alteración de los ecosistemas se recalcan en forma alarmante en publicaciones proteccionistas de la naturaleza, aunque no existe un criterio definido de estas evaluaciones, y sí una notable diferencia en las apreciaciones del número de especies que posiblemente se extingan en los trópicos para fines del siglo, que van desde menos del 10%, hasta un 60% (Lugo, 1988). Esto es

de esperarse debido a que es impredecible extrapolar sobre el tiempo y las actividades humanas tan cambiantes, por lo que es difícil señalar cifras exactas.

Por otra parte, se argumenta que las extinciones masivas de especies son fenómenos naturales en la historia de la vida del planeta. Existen evidencias geológicas de que estos fenómenos han dado paso a nuevas formas de vida (Wilson, 1989), resultando la más reciente la desaparición de los dinosaurios (65 millones de años: fin del Cretácico), esta fue menor comparada con la del Pérmico (240 millones de años), cuando se extinguieron entre el 77 y 96% de todas las especies de animales marinos. Se desconocen las causas exactas de estas extinciones masivas (Wolf, 1988). Sin embargo es imprescindible considerar que estos eran desastres naturales provocados por el proceso evolutivo mismo y no como en el caso de la extinción actual de especies por efecto directo de la interacción del hombre.

Sobre un posible cambio de clima que pueda acelerar el proceso de alteración y destrucción de la vida en el planeta, algunos sugieren que este cambio se inició hace 200 años (Graedel and Crutzen, 1989), seguramente con el inicio de la Revolución Industrial de las últimas décadas del siglo XVIII (a partir de 1760-1780) en Inglaterra y la liberación de gases a la atmósfera con la utilización de combustible fósil (carbón mineral y petróleo) en las diferentes actividades humanas y en la expansión de la agricultura, acarreado a su paso deforestación (tala y quema de bosques). En relación con los bosques y selvas tropicales, se reporta que estos ecosistemas representan el mayor reservorio individual de carbono de las biotas y reportan

asimismo la mayor producción primaria neta total. Se ha comprobado que la mayor parte de la fotosíntesis tiene lugar en la tierra, y no en los océanos como se creía anteriormente (Woodwell, 1978). Debido a los cambios drásticos que han venido suscitándose en relación al ambiente, se ha observado un incremento de dióxido de carbono, metano y otros gases en la atmósfera (Graedel and Crutzen, 1989; Woodwell, 1978; Bolaños, 1990; White, 1990). El observatorio de Mauna Loa, en la isla de Hawaii, ha registrado un aumento de dióxido de carbono en la atmósfera desde 1958, reportando ascensos de 0.5 ppm/año (Woodwell, 1978; Bolaños, 1990; White, 1990). Esto se atribuye a varias causas, siendo la deforestación de los bosques y selvas tropicales la que más contribuye, debido a la combustión de carbono almacenado en estas regiones y en la desaparición de los organismos que son fijadores y almacenadores de carbono en los ecosistemas no alterados. Aunado a esto, la emisión adicional producida por la descomposición del húmus almacenado en el suelo, y a otro factor de igual magnitud que es la combustión de energéticos fósiles (carbón mineral y petróleo). Es importante mencionar que la vida promedio del dióxido de carbono y otros gases en la atmósfera es mayor de 60 años, lo cual agudiza aún más el problema con la acumulación y el aumento constante de estos gases (Graedel and Crutzen, 1989). Además, la adición de otros gases como el metano, dióxido de azufre (SO_2), óxidos de nitrógeno (NO y NO_2) y diversos clorofluorocarbonos (Graedel and Crutzen 1989, Schneider 1989; Bolaños) están provocando el adelgazamiento de la capa de ozono (O_3) en la estratósfera, la

cual evita la penetración en un porcentaje alto de radiaciones UV, siendo altamente peligrosas para cualquier forma de vida del planeta cuando se presenta en altas intensidades (Stolarski, 1988; Bolaños, 1990).

El incremento de CO₂ en la atmósfera está provocando el llamado efecto invernadero que presagia un calentamiento general del clima en las próximas décadas (Woodwell, 1978). Aunque hay quienes indican que la acumulación de gases en la atmósfera con efecto invernadero, no se puede saber a ciencia cierta qué repercusión tendrá con respecto al cambio de clima (White, 1990).

I.2 Situación de la diversidad vegetal en México.

México debido a su situación geográfica, a su gran diversidad de climas y a lo accidentado de su topografía, alberga una flora que ha sido considerada de las más ricas y variadas del planeta (Rzedowski, 1978; Toledo, 1988), calculándose aproximadamente 30 mil especies de plantas vasculares, prediciéndose hasta un 30% de endemismo (Toledo, 1988). Este país es considerado centro de evolución de floras (Rzedowski, 1978). A manera de ejemplo, se puede decir que nuestro país presenta una flora más diversa que la Unión Soviética; también que la de Estados Unidos de Norte América y Canadá juntas y podría ser mayor a la de la República de China (Gómez-Pompa, 1985; Toledo, 1988). Nuestra flora no sólo es notable por su riqueza florística, sino también por su peculiaridad, despertando gran interés científico, a finales de la década pasada se descubrió una nueva familia (Lacandoniaceae) en la selva Lacandona del sureste mexicano, representada por la especie Lacandonia schismatica (Martínez y Ramos, 1989). De acuerdo a los estudios

anatómicos realizados, especialistas taxónomos P. Raven y A. Cronquist expresan que la planta parece haber protagonizado posibles procesos macroevolutivos, como lo demuestra la posición inversa del gineceo y el androceo con respecto a las aproximadamente 248 mil especies conocidas de plantas fanerógamas (Ladislao, 1988; Martínez y Ramos, 1989).

Esta gran diversidad vegetal se ve amenazada, periódicamente aparecen listas con especies consideradas extintas y en peligro de extinción (I.U.C.N., 1983, 1985; Villa-Lobos, 1988a; Vovides, 1981, 1988). Los métodos de destrucción y perturbación de la vegetación han sido diversos, algunos de ellos de efecto directo y otros indirecto (Rzedowski, 1978). Entre los primeros cabe mencionar como principales: la tala desmedida y desmonte de bosques y selvas tropicales debido a la expansión de la agricultura y ganadería y la explotación selectiva e irracional de algunas especies útiles económicamente; la quema de bosques con fines de limpia; las inundaciones de grandes extensiones de terreno para el desarrollo de presas generadoras de energía eléctrica, etc. Los segundos tienen que ver con la modificación o eliminación del ambiente ecológico necesario para el desarrollo de una determinada comunidad biótica, factores secundarios como la erosión de los suelos, modificación del régimen hídrico de la localidad y a veces del clima mismo, ocasionado por los desmontes masivos; la contaminación del aire y del agua, influido por la quema, la contaminación por pesticidas y otros factores aportados en la protección de los cultivos agrícolas.

En el caso de las especies silvestres con valor ornamental,

el factor esencial de destrucción han sido las colectas exhaustivas, debido a la falta de un control eficiente ha provocado sobrecolectas de plantas en los habitats naturales con fines comerciales, que abastecen los mercados de Estados Unidos, Japón y Europa, con especies de orquídeas, cícadas y principalmente cactáceas. Este hecho condujo a que las poblaciones de estas plantas disminuyeran en forma alarmante y a pesar de dictar leyes de prohibición para la colecta y exportación, ésta ha continuado en forma de contrabando, es así como algunas especies han sido prácticamente exterminadas (Bravo-Hollis, 1978; Sánchez-Mejorada, 1979, 1982a,b). Como se puede observar fácilmente, la influencia humana sobre la vegetación de México resulta en general altamente destructiva (Rzedowski, 1978; Toledo, 1988; Bolaños, 1990).

I.3 Posibles soluciones para la Conservación de nuestros Ecosistemas.

Acciones prácticas y con posibilidades de establecerse como medidas de conservación de la naturaleza, se pueden dividir en cinco tipos principalmente (Vázquez y Orozco, 1989): 1) creación de áreas protegidas, 2) aprovechamiento racional de los recursos naturales, 3) establecimiento de bancos de germoplasma, 4) emisión de leyes y reglamentos para proteger la naturaleza y 5) acciones educativas que conformen una nueva mentalidad con respecto a nuestra relación con la naturaleza.

1) Creación de áreas protegidas. En México, el gobierno interviene por primera vez en la conservación de la naturaleza en 1786 con la protección oficial del bosque del Desierto de los Leones para resguardar sus manantiales. Antes del Gobierno del

General Lázaro Cárdenas se había hecho muy poco en lo que respecta al establecimiento de parques nacionales y reservas naturales, este hecho sobre conservación fue propuesto principalmente por el Ingeniero Miguel Angel de Quevedo, creando 36 parques nacionales en 17 estados, con una superficie total de 800 000 hectáreas. Llegando en 1989 a constituir 58 parques o reservas ecológicas, de las cuales en varias de ellas no existe la debida protección y las diversas actividades humanas como ya se han mencionado anteriormente siguen perturbandolas continuamente.

Para que la protección de las especies en peligro de extinción y reservas ecológicas sea real, se requiere participación de la comunidad educandola y sensibilizandola, mayor conocimiento de los recursos biológicos, mejor vigilancia y en ciertos casos establecimiento de barreras físicas. Un ejemplo de esta necesidad lo tenemos con la reserva ecológica inafectable del Pedregal de San Angel dentro de Ciudad Universitaria de la U.N.A.M., con 124 ha. (Carabias y Meave, 1987); aunque recientemente (20 de agosto de 1990) se publicó en la Gaceta de la UNAM, el acuerdo firmado por el Rector Dr. J. Sarukhán, incrementando la superficie a 146.9 ha. En esta reserva, al no existir una barrera aislante, cotidianamente asisten a la reserva personas que extraen del lugar plantas de algunas especies comerciales ornamentales, medicinales, alimenticias, etc.; ocurren igualmente incendios en época de sequías, ocasionados probablemente por descuidos humanos (Carabias y Meave, 1987). Además la reserva es utilizada por algunas personas como tiradero

de basura doméstica y desechos de construcción; están presentes también especies no nativas (ej. gatos y perros domésticos, eucaliptos, etc.) que resultan agresivas a la vida silvestre. La situación de esta reserva aún con sus características propias se repite en otras. La creación de áreas de comunidades naturales protegidas deben continuar con base a los siguientes criterios (Vázquez y Orozco, 1989): 1) definición de las áreas naturales que por su composición y estructura se encuentren mejor conservadas, 2) buena representación de la diversidad de ambientes existentes en el territorio de México, a este respecto, se reporta que existen habitats que no han sido tomados en cuenta para su conservación, y en otros se cuenta con reservas muy pequeñas no representativas de la diversidad biológica, un ejemplo claro para el primer caso son las zonas costeras y habitats marinos, para el segundo es importante extender la superficie de las regiones con mayor diversidad, como las zonas templadas subhúmedas entre otras (Toledo, 1988; Toledo and Ordoñez, 1990), 3) superficies lo suficientemente amplias para permitir la conservación de las especies representativas de todos los niveles tróficos del ecosistema y de un cierto grado de variabilidad genética intraespecífica, 4) énfasis especial en áreas únicas, que contengan especies en peligro de extinción o que sean especialmente vulnerables al deterioro y 5) protección especial a zonas como cabeceras de cuencas de ríos, vegetación costera, cinturones forestales suburbanos, etc., cuya destrucción trae serias consecuencias en el régimen de los ríos, en la productividad costera y en los factores que generan contaminación atmosférica. Es importante, para mejorar eficientemente los

puntos anteriores, que las áreas circunvecinas cambien su sistema de explotación, de tal forma que no sean un agente que afecte la reserva a proteger.

2) Aprovechamiento racional de los recursos naturales. Para conocer el potencial productivo de una comunidad natural, se requiere de un conocimiento biológico ecológico profundo de su composición, dinámica y productividad de biomasa, que permita determinar cuanto es posible extraer de su flora o de su fauna sin alterar su equilibrio. De hecho, a veces la prohibición total del uso o explotación de cierto recurso puede ser más perjudicial para su conservación que la explotación racional. En el caso de plantas ornamentales es recomendable establecer metodologías de propagación masiva, utilizando técnicas de cultivo de tejidos, cuya aplicación a especies nativas y en peligro de extinción es reciente. En los inicios de la década de los ochenta Wochok (1981) analiza los avances en la propagación de especies amenazadas utilizando las técnicas de cultivo de tejidos vegetales . La propagación de estas especies por cualquier vía ayudaría a reducir las colectas de campo con fines comerciales y serviría como fuente de recursos económicos al establecerse sistemas de comercialización basados en métodos de propagación controlados.

Organizaciones internacionales han propuesto un acuerdo para la comercialización de especies silvestres que permita establecer un posible equilibrio entre los siguientes aspectos: 1) que los países aseguren el acceso a sus especies nativas, 2) que el usuario o interesados de las especies paguen alguna forma de

derechos a los países poseedores de la biodiversidad y 3) que dichos países estén obligados a conservar las especies silvestres en su medio natural (Villa-Lobos, 1988b)

3) Bancos de Germoplasma. Se definen como la conservación de la diversidad genética. Esto puede lograrse en distintas formas: en reservas ecológicas in situ. Países de Latinoamérica que enfrentan una situación económica difícil, organizaciones internacionales como: Conservación internacional (CI); el Fondo Mundial para la Naturaleza (WWF); y la Conservación de la Naturaleza (TCN), han canjeado parte de la deuda externa de Bolivia, Ecuador y Costa Rica, con el compromiso fundamental de proteger o mantener mayor vigilancia en sus propias reservas (Villa-Lobos, 1988c). También existen bancos de propágulos ex situ como semillas y esporas; bancos de cultivo de tejidos ex situ, un sistema relativamente nuevo para conservar tejidos y plantas. Para ello se han desarrollado diferentes vías de preservación del germoplasma, teniendo como meta principal el establecer las condiciones experimentales que permitan un crecimiento mínimo o éste sea nulo sin que se presenten alteraciones, es decir que se mantenga la estabilidad genética. De acuerdo al tiempo de almacenamiento se han dividido en corto-mediano y largo plazo (Rubluo, 1985). La preservación a corto-mediano plazo va de unos meses hasta menos de 5 años (Schilde-Rentshler et al., 1982), el cual depende en gran medida del tiempo que dure el ciclo de vida de la planta a conservar; esta se logra con el uso de bajas temperaturas (cerca a 4°C), inductores de "stress" osmótico, medios nutritivos con bajas cantidades de nutrimentos, la utilización de fitohormonas

retardadoras del crecimiento, y entre otros de la combinación de varios de estos factores. La preservación a largo plazo por medio de la criopreservación, a temperatura del nitrógeno líquido (-196°C), intenta congelar células y tejidos por 5 años o por tiempo indefinido, que para mantener la estabilidad genética bajo este proceso de almacenamiento, Karta (1981, 1982) establece que es posible utilizando tejidos meristemáticos. Establecimiento de Jardines botánicos ex situ, durante años han sido los mayores centros para el estudio científico de la riqueza florística, han formado parte del mecanismo para la introducción y evaluación de especies vegetales en la agricultura, horticultura, silvicultura y medicina (I.U.C.N., 1987). Han constituido islas artificiales de la diversidad que desempeñan una función vital en la conservación de la variabilidad genética y en la educación, con más de 1400 jardines botánicos, pueden convertirse en la vitrina del mundo cubriendo la diversidad de las plantas (Villa-Lobos, 1988b); aunque Qualset (1990) y Ashton (1990) reportan que bajo condiciones ex situ no es posible almacenar toda la diversidad existente en cada una de las especies, por lo que sugiere la conservación in situ. Los bancos de germoplasma de uno u otro tipo, son y serán de suma importancia para utilizar la diversidad genética en el momento que se requiera en beneficio del hombre y la protección o recuperación de especies en peligro de extinción.

4) Emisión de leyes y reglamentos para proteger la naturaleza. En México, actualmente existen leyes y reglamentos destinados a mantener un equilibrio ecológico, como la Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente,

aprobada y publicada en el Diario Oficial (28 de enero de 1988). El 29 de agosto de 1940, se dictó en el Diario Oficial un Acuerdo para la conservación y mejoramiento de las orquídeas y cactáceas silvestres, donde se estableció suspender la recolección y explotación de plantas, frutos y semillas de estas familias (ver apéndice 12).

El aspecto más difícil de llevar a la práctica a toda ley o reglamento no es el idealizarlos y aprobarlos, sino hacer que tengan una funcionalidad y validez en la práctica y que sean respetados y ejercidos en la forma en que fueron concebidos.

En nuestro país, por falta de un mejor conocimiento de nuestros recursos naturales y al poco presupuesto que se destina para su protección, existen saqueos inmoderados de especies vegetales amenazadas de extinción (ver apéndices 7, 8, 9, 10 y 11), violando leyes nacionales y acuerdos internacionales de protección a dichas especies.

5) Acciones educativas. Es tradicional la visión de que los seres vivos han sido creados para nuestro uso y beneficio y que no tienen otro valor que el que nuestra sociedad les atribuye. Actualmente la divulgación científica, utiliza diferentes medios de difusión, y transmite el papel que juegan los seres vivos en el planeta, lo cual está permitiendo un importante cambio de actitud en una parte de la población de México, logrando que cierto número de gente muestre un respeto mayor a la naturaleza y lo transmita a sus hijos.

Este punto es muy importante, del cual aún resta mucho por hacer. Como concientizar a los campesinos sobre la riqueza natural y las formas de ser explotadas sin que se perturben las

poblaciones silvestres, debido a que en la actualidad su situación económica los presiona a actuar en contra del ambiente, por lo que es importante sensibilizarlos a la problemática existente, y paralelamente resolver sus problemas socio-económicos.

I.4 Libro Rojo (IUCN) de especies vegetales amenazadas en la naturaleza.

Existe una organización informativa denominada Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos naturales (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, IUCN), la cual edita periódicamente el Libro Rojo de Datos con las categorías de alteración de las especies en forma individual en los habitats naturales, y se aplican tanto para la fauna como para la flora; la perturbación de las especies en la naturaleza la definen de la manera siguiente (Lucas and Synge, 1978):

EXTINTAS (Ex)

Esta categoría solo se usa para especies que se conoce que no existen en el campo después de repetidas búsquedas en las localidades tipo y en otras en las que se encontraban o en lugares semejantes. Además se incluyen especies que están extintas en el campo pero sobreviven en condiciones de cultivo.

EN PELIGRO DE EXTINCIÓN (E)

Se trata de taxa en peligro de desaparecer, y cuya sobrevivencia es poco probable si continúan operando los factores causales. Se incluyen taxa cuyos números de individuos han sido reducidos a un nivel crítico o aquellos cuyos habitats han sido

tan drásticamente reducidos que podemos juzgar que ahora están en inminente peligro de extinción.

VULNERABLES (V)

Taxa que se cree podrían pasar a la categoría anterior en un futuro cercano si los factores causales continúan operando. Se incluyen taxa en los que la mayoría de las poblaciones decrecen debido a la sobreexplotación, la destrucción extensiva del habitat u otras formas de perturbación; taxa cuyas poblaciones han sido seriamente disminuidas y aquellos en que existencia posterior no ha sido asegurada; y también taxa con poblaciones que son todavía numerosas pero que estan bajo amenaza de factores adversos serios a lo largo de su área de distribución.

RARAS (R)

Taxa con pequeñas poblaciones que en la actualidad no estan en peligro, ni son vulnerables, pero corren ese riesgo. Estos taxa generalmente están muy localizados dentro de áreas geográficas o habitats muy restringidos o se encuentran distribuidos en densidades muy bajas a través de su área de distribución.

INDETERMINADAS (I)

Taxa con poca información de la distribución de la especie, por lo que no es posible definir en cual de las cuatro categorías anteriores deben ser colocadas.

Esta categoría es usada para especies reportadas como "Extinta" o "posiblemente Extinta" sobre la suposición de que puede estar 'Extinta' o 'En peligro de extinción'.

I.5 Tratados sobre Conservación a nivel Internacional.

A nivel internacional existe una organización para la

protección de la flora y fauna silvestres amenazadas de extinción, fue establecida en 1973 con la firma de 51 países en la Convención de Washington, firmada en Washington D.C. Estados Unidos de Norte América y denominada Convención Internacional sobre el Tráfico de Especies en Peligro de Extinción (The Convention on International Trade in Endangered Species, C.I.T.E.S.), en 1975, C.I.T.E.S. entró en vigor después de haber sido ratificada por 10 países (Nigeria, Suecia, Suiza, Chipre, Emiratos Arabes Unidos, Estados Unidos de Norte América, Ecuador, Uruguay, y Túnez); en 1982 se adoptó el reglamento en la Comunidad Económica Europea (C.E.E.); y en 1987, se contaba ya con 96 países miembros de C.I.T.E.S., la mayoría de los países miembros de la C.E.E., han ratificado la Convención. México es uno de los países que no han firmado la Convención (C.I.T.E.S., 1987). Vovides (comunicación personal: oct. 1990) indica que se estan desarrollando estudios por parte de SEDUE para analizar la forma en que México se incorporará próximamente al C.I.T.E.S.

C.I.T.E.S., tiene como objetivo detener la desaparición de plantas y animales, mediante el compromiso de un gran número de países para limitar o no autorizar el comercio de plantas y animales amenazados o de permitir un comercio que no ponga en peligro su sobrevivencia. La dinámica de la Convención de Washington se basa esencialmente en la expedición de permisos y el control en las aduanas, además de generar información al público, su secretaría internacional actualmente esta situada en Lausanna, Suiza (C.I.T.E.S., 1987).

Según el grado de alteración en la naturaleza, las plantas

son clasificadas en 3 grupos, como anexos de la Convención de Washington:

Anexo 1, comprende las especies que están fuertemente amenazadas de extinción en la naturaleza, de tal manera que todo comercio se prohíbe. Todas las especies de este anexo propagadas artificialmente a partir de semillas, de brotes, de cultivo de tejidos o de esporas, pasan a ser consideradas como plantas del anexo 2 (C.I.T.E.S., 1987); en relación a las orquídeas, Stewart (1990) reporta que la C.I.T.E.S., únicamente incluye 10 especies de orquídeas en el anexo 1: Vanda coerulea Griff. ex Lindl., Renanthera bella F.F.Wood, Cattleya skinneri Batem., C. trianae Lindl. and Reichb., Laelia lobata Veitch., L. jongheana Reichb., Lycaste virginialis (L. skinneri) (Batem. ex Lindl) Lindl., Peristeria elata Hook., Didicicia cunninghamii King & Prain, Paphiopedilum druryi (Beddome) Stein.

Anexo 2, comprende las especies susceptibles a ser amenazadas de extinción como consecuencia de un comercio muy intenso. La Convención de Washington reglamenta este comercio, donde la importación y exportación se autoriza únicamente tomando en cuenta los siguientes criterios. Las excepciones para exportar plantas de este anexo son las siguientes: 1) las semillas, las esporas y el polen de la mayoría de las especies del anexo 2 pueden ser libremente comercializados, a excepción de las semillas de las cícadas; 2) para cultivos de tejidos y los cultivos de plantas in vitro, C.I.T.E.S. informa que no son necesarios los permisos por parte de la Convención, siempre y cuando se les compruebe que fueron propagadas por estas vías; 3) los frutos de las cactáceas silvestres o cultivadas y de las

orquídeas cultivadas como Vanilla spp. no están tomadas en cuenta por el reglamento de la Convención, la flor de corte de las orquídeas cultivadas, pueden igualmente ser comercializadas sin permisos de C.I.T.E.S. (C.I.T.E.S., 1987).

Anexo 3, comprende las especies silvestres que en un país determinado pueden estar amenazadas de extinción como consecuencia de un intenso comercio, aunque estas mismas especies en otro país sean abundantes y permitida su comercialización, se prohíbe su exportación, pidiendo la ayuda de otros países miembros de C.I.T.E.S. (C.I.T.E.S., 1987).

El reglamento (3626/82) de la C.E.E., que entró en vigor el 1° de junio de 1984, toma medidas más estrictas para la conservación de las especies incluidas en el anexo 2 por C.I.T.E.S. La C.E.E. estima que la protección actual de algunas especies del anexo 2 de C.I.T.E.S. no es suficiente, las especies ahí reportadas se han incluido en una nueva categoría "C", subdividida en 2 listas correspondiente a los Anexos C1 y C2. Las especies retomadas en el Anexo C1 son consideradas como especies del Anexo 1 de la Convención, donde todo comercio está prohibido. Para las especies retomadas en el Anexo C2, implantaron condiciones suplementarias en relación a un permiso de importación, es necesario que la colecta de estos especímenes en medios silvestres no tenga influencia nociva sobre la conservación de las especies ahí existentes. Con esto se retoma en detalle las condiciones de introducción, de exportación y de tránsito de los especímenes de los Anexos 1, 2, 3, C1 y C2 en los países de la C.E.E. (C.I.T.E.S., 1987).

Existe menor vigilancia en los países en desarrollo sobre la protección de especies en peligro de extinción, y son los países desarrollados que presentan una demanda en estas plantas con valor principalmente de tipo ornamental. Se cuenta con ejemplos de exportación ilegal hacia los Estados Unidos y Europa (Sánchez-Mejorada, 1979, 1982b; ver apéndices 7, 8, 9, 10 y 11), de especies mexicanas de cícadas, agaves, cactáceas, orquídeas, euforbias, etc., que se introducen sin importarles su sanidad. A pesar de que en ocasiones se han decomisado cargas valiosas de especies silvestres, estas plantas en la mayoría de los casos nunca se regresan al habitat original. Debido a la gran cantidad de plantas extraídas, es probable que se altera el equilibrio ecológico.

Uno de los motivos por los que México no ha firmado el tratado de C.I.T.E.S., se debe probablemente a que hay de por medio intereses sobre exportación y captación de divisas, fuente de trabajo para los recolectores. Este sistema de explotación ha provocado que muchas de las especies se cataloguen con cierto nivel de alteración en el habitat natural, obteniendo cuantiosas sumas de dinero. Estas exportaciones son reportadas para el dominio público en columnas periodísticas (Balboa, 1987), citando la fuente de obtención de los datos en el Market New Division Fruit Vegetable de los Estados Unidos de Norte América, donde se asientan nombres de las personas, especies de plantas, cantidad, periodicidad, precio, etc. Por citar un ejemplo, el mercado de la palma camedor (Chamaedorea elegans Mart.) es acaparado por la Jewel Foliage Co. y la Continental Wholesale Florists (González, 1985; Oyama, 1987).

I.6 Conservación de especies vegetales.

El efecto de las actividades humanas sobre los ecosistemas naturales, se expresa en la disminución de las poblaciones o erosión genética y en muchos casos repercute en la desaparición de especies. Se estima que la desaparición de cada especie vegetal puede arrastrar consigo de 10 a 30 especies dependientes. Por lo tanto, la diversidad vegetal es un factor fundamental que controla la diversidad de otros organismos y la estabilidad de los ecosistemas del planeta (Raven, 1976).

En un principio la conservación de las plantas se ha hecho a través de Jardines Botánicos, conservación ex situ, de los cuales, el origen de algunos es tan antiguo como el México prehipánico en que se estableció por ej. el Jardín Botánico por Moctezuma en Oaxtepec (Vovides, 1979). Sin embargo la interacción de las especies bajo estas condiciones en relación con su medio ambiente se ve interrumpida, además de que no es posible mantener una gran diversidad biológica en estas condiciones. Esto despertó el interés de establecer la conservación en los habitats naturales en forma de reservas ecológicas in situ que permitieran salvaguardar la diversidad biológica de las diferentes comunidades (Gegina, 1979; Hall and Rycroft, 1979; Vovides, 1979; Wrigley, 1979).

Otro sistema de conservación in situ es el utilizado desde hace algunas décadas en forma extensiva y selectiva en agronomía forestal; se desarrollan programas de cultivo de árboles con fines de explotación maderera y sus derivados. Este sistema dista mucho de preservar la comunidad ahí existente, además en la

población reintroducida en la mayoría de los casos no se contempla la diversidad genética y sí una selección de individuos con características económicamente importantes (Labelle, 1987; Mendoza, 1987; Nwonwv, 1987).

Ciertas zonas perturbadas por las actividades del hombre que posteriormente toman interés para su protección y recuperación de los habitats, han sido declaradas reservas naturales protegidas, tal es el caso de la región de dunas del litoral del mar Mediterráneo en Francia, donde han restablecido comunidades vegetales a partir de la multiplicación y reintroducción de especies amenazadas, restringiendo el acceso a las personas que con ciertas actividades (ej. automovilismo y motociclismo deportivo) perturban el ecosistema restaurado (Oliver, 1979).

La utilización del Cultivo de Tejidos ha tenido un impacto en la agricultura desde la década de los setenta, estableciendo nuevas y mejores alternativas de mejoramiento genético, rescate de embriones, hibridación, cultivo de tejidos haploides, obtención de plantas libres de patógenos y rápida propagación clonal (Murashige, 1978). La utilización de estas técnicas se justifican cuando por los métodos tradicionales, germinación de semillas (propagación sexual) y esquejes o propágulos (propagación asexual), la producción de nuevos individuos es muy lenta y limitada o bien resulta difícil establecer sistemas de propagación masiva (Murashige, 1974). Siendo el caso de los miembros de la familia Orchidaceae, donde sus semillas son muy pequeñas (<1.5 mm de largo / <0.3 mm de ancho; <0.00001 g/semilla), con escasa reserva alimenticia, se presentan

algunas formas de nutrición muy complejas, involucrando en la manera de obtener sus recursos nutricionales, mecanismos como la simbiosis, el saprofitismo o parasitismo (Hutchings, 1989); además, la propagación asexual, por métodos tradicionales (ej. separación de una colonia o pseudobulbos) puede llegar a tomar hasta 10 años cultivar de 6 a 12 plantas de buen tamaño, igual a la que les dió origen (Morel, 1974).

Las técnicas modernas de Cultivo de Tejidos Vegetales que han sido aplicadas intensamente con plantas ornamentales desde la década de los setenta se presenta como una alternativa para ser utilizada en la propagación de plantas amenazadas de las cuales existe escaso material biológico y con dificultades en su propagación por métodos tradicionales (Raven, 1976; Rao, 1977; Arditti *et al.*, 1981; Wochok, 1981; Snow, 1985; Stewart, 1989), incluso se ha llegado a utilizar con buen éxito en la propagación de especies amenazadas (Martínez, 1989; Martínez and Rubluo, 1987; Martínez-Vázquez and Rubluo, 1989; Rubluo *et al.*, 1989; Iriundo and Pérez, 1990).

Martin (1984) reporta que una vez establecida la multiplicación vegetativa *in vitro*, permite obtener 200 000 a 400 000 plantas (ej. rosales o perales o manzanos, etc.) en un año a partir de una sola yema, que en comparación al método tradicional de injerto o estaca, solamente genera de 30 a 50 descendientes en un tiempo de dos años.

En la década de los ochenta, se intensificaron los trabajos de cultivo *in vitro* de orquídeas con valor comercial, también se desarrollaron algunos con fines de investigación con especies

silvestres que aparentemente no presentan interés ornamental. Estableciéndose así, sistemas de germinación asimbiótica de orquídeas terrestres de Norte América, germinación simbiótica y asimbiótica de orquídeas de Europa, germinación asimbiótica de terrestres y epífitas de Australia y Asia (Arditti et al., 1982c).

Lo anterior muestra que con las especies silvestres terrestres y epífitas de Latinoamérica, que no presentan un interés comercial inmediato, no se han realizado trabajos profundos en germinación asimbiótica y cultivo de tejidos, esto es lamentable, debido a que en la actualidad se están destruyendo los habitats naturales, especialmente en los trópicos. Además se reporta que durante las próximas décadas muchos miles de especies se extinguirán o sus poblaciones silvestres se verán severamente erosionadas genéticamente, a menos que se tomen medidas preventivas (Heywood, 1987).

Debido a los factores antes mencionados, al poco interés comercial de muchas de nuestras especies silvestres para desarrollar sistemas de propagación y a la dificultad de propagarse en forma tradicional que en general presentan las orquídeas, es fundamental utilizar las técnicas de Cultivo de Tejidos en especies de orquídeas mexicanas amenazadas de extinción, para explorar su propagación masiva, y poder iniciar la reintroducción de las poblaciones obtenidas in vitro, para tal efecto se eligieron las especies descritas en la tabla A.

Sin embargo, nuestro trabajo se inició primeramente con un ejemplo de reintroducción en el habitat natural (reserva ecológica de la U.N.A.M., Pedregal de San Angel, D.F.) de una

TABLE A. ORQUÍDEAS MEXICANAS RARAS O EN PELIGRO DE EXTINCIÓN, PROPAGADAS POR CULTIVO IN VITRO.

ESPECIE	DISTRIBUCIÓN EN MEX. #	STATUS EN MEXICO	HABITO #	TIPO DE VEGETACIÓN # (a)
<u>Bletia urbana</u> Dressler	D.F., Oax.	E (5)	Terrestre	Matorral herbófilo; B. (bosque) pino-encino.
<u>Encyclia aiata</u> (Bates.) Schltr.	Caap, Chis, O.R., Tab, Ver, Yuc.		Epífita	Manglar; selva mediana subcaducifolia.
<u>E. citrina</u> (Clayton & Lex.) Dressler	Tlax, Jal, Mich, Gro, Oax, Ver, Nay, Sin.	V (1,2)	Epífita	B. (bosque) encino; matorral esclerófilo; B. mesófilo; B. pino-encino.
<u>Laelia anceps</u> Lindl.	Hgo, M.L., Oax, Pue, S.L.P., Tamps, Ver.	E(1), I(3,4), V(2).	Epífita	Ecotonia selva baja caducifolia-E. caducifolia; B. encino.
<u>Leoboglossum cordata</u> (Lindl.) Halbring	Ver, Chis, Pue, Oax.		Epífita	Bosque mesófilo de montaña; B. encino; B. de pino-encino.
<u>L. ehrenbergii</u> (Link, Kl. & Otto) Halbring	Hgo, Oax, Pue, Ver.	R (1,3)	Epífita	B. mesófilo de montaña; B. matorral de pino-encino.
<u>Lycaste arcuata</u> (Graham ex Hooker) Lindl.	Chis, Hgo, Oax, Pue, S.L.P. (?), Tamps (?), Ver.	V (7)	Epif.-Terr.	Selva alta perennifolia; B. mesófilo de montaña.
<u>L. skinneri</u> (Bates. ex Lindl.) Lindl. var. <u>skinneri</u> #	Chis.	E (2,4)	Epif.-Terr.	B. mesófilo de montaña.
<u>L. skinneri</u> (Bates. ex Lindl.) Lindl. var. <u>alba</u> Doobrain. #	Chis.	E (2,4)	Epif.-Terr.	B. mesófilo de montaña.
<u>Oncidium maculatum</u> Lindl.	Chis, Ver, Oax.		Epífita	B. tropical seco; ecotono selva mediana subcaducifolia-encino; B. encino.
<u>O. stramineum</u> (Lindl.) Bates.	Pue(?), Ver.	E(1), V(2,6), I(4)	Epífita	Selva mediana subperennifolia; ecotonia selva baja caducifolia-B. caducifolia; Selva mediana subcaducifolia; B. encino.
<u>Rhyncholaelia glauca</u> (Lindl.) Schltr.	Chis, Ver.		Epífita	Selva alta perennifolia; B. de pino; selva mediana subperennifolia; B. encino; ecotono B. encino-selva mediana subcaducifolia.
<u>Sobralia macrantha</u> Lindl.	Chis, Gro, Oax, Pue, Ver.		Epif.-Terr.	Selva mediana perennifolia; B. caducifolia; B. encino.

(1)= IUCN, 1985; (2)= Vovides, 1981; (3)= Villa-Lobos, 1988a; (4)= Vovides, 1988; (5)= Rzedowski, 1979; (6)= Jimenez, 1990; (7)= Salazar, 1990; (#)= Herbarios MEXU y AMO (enero 1991); (?)= de dudosa distribución, para O. stramineum en Puebla citado por Soto (1988), sin embargo, Vovides (1988) y Jimenez (1990) lo reporta para el centro de Veracruz; (##)= incluidas en el anexo I de la C.I.F.E.S.; (a)= los colectores usaron 2 tipos de clasificación de la vegetación: Miranda y Hernández L. (1963) y Rzedowski (1978).

población de la orquídea, Bletia urbana Dressler considerada en peligro de extinción. Las plantas liberadas disminuyeron en número (aproximadamente a 15% del total), las cuales han permanecido en condiciones naturales por más de 3 años (Rubluo et al., 1989).

Existen trabajos fundamentados sobre reintroducción de especies en peligro de extinción, como la iniciada en el Jardín Botánico del Desierto de Arizona, Estados Unidos de Norte América, donde se realizan investigaciones en la propagación tradicional y liberación de especies de cactáceas las cuales son propagadas a partir de semillas en sistemas de viveros. Las investigaciones de los aspectos ecológicos y hortícolas, son realizadas por especialistas en botánica, ecología y horticultura, para poder asegurar el restablecimiento (permanencia) de las poblaciones reintroducidas (Ecker, 1989).

1) Los estudios ecológicos, indican que es importante analizar el clima de la comunidad, la topografía y la altitud entre otros aspectos físicos y plantas u otros organismos con que se asocia para adaptarse y evolucionar en su ambiente natural. Para lo cual se deberán tomar en cuenta factores como: a) la capacidad reproductiva, lo que implica estudios cuidadosos de polinización y la biología reproductiva de las plantas; b) el tomar en cuenta la variabilidad genética, mediante la colecta de plantas o material biológico seleccionado de diferentes sitios dentro de una población con variabilidad morfológica y áreas de una población; sin embargo recomienda que hay que tener precaución en prever en la introducción de otra población

diferente de habitats distintos, ya que se pueden interrumpir los complejos de genes coadaptados de las poblaciones iniciales y pueden llevar a la extinción de pequeñas poblaciones; c) el estudio minucioso de las asociaciones coevolutivas como la simbiosis y la presencia de polinizadores específicos que presentan en forma natural, es necesario poder seguir estos procesos conforme se introducen las plantas al habitat natural, para evitar en algunos casos que por desconocimiento pueda provocarse casos de herbivorismo, parasitismo e incluso la muerte, etc.; d) la selección del sitio, junto con la selección de los microhabitats son los factores más críticos a considerar, se recomienda que la reintroducción deberá situarse en lugares donde crecían en forma natural o lo más cercano posible. Esto ayudará a evitar problemas tales como la introducción de complejos genéticos no adaptados, la falta de polinizadores, tipos de suelo que no son apropiados y los problemas climáticos. En estos sitios de plantación se deberá contemplar la presencia de plantas nodrizas apropiadas si es que las presentan en forma natural.

2) Sobre las prácticas hortícolas Ecker (1989) indica que son también importantes para el éxito de la reintroducción. La muestra de suelo para el desarrollo de los propágulos o plantas a reintroducir, deberá ser obtenida si es posible del mismo lugar donde crecen o crecían las plantas en forma silvestre, para que la textura, concentración de iones y cualquier otra característica del suelo sean las apropiadas para la reintroducción y mejor adaptación al ambiente natural. La aplicación de fertilizante durante el desarrollo de las plantas

en el vivero deberá ser adecuada, ya que se pueden desarrollar muy rápido, sin embargo sus experiencias en las plantas liberadas de Mammillaria thornberi Orcutt (Cactaceae) de zonas áridas en peligro de extinción, les mostró una mayor mortalidad en comparación con las que no se les adicionó o se les aplicaron bajas concentraciones de fertilizante y se les retiró un mes antes de la plantación. Ecker (1989) indica que las plantas que en forma natural se les ha detectado asociación con micorrizas, se les deberá tener precaución de no aplicar fungicidas; estudios realizados en plantas perennes silvestres que fueron preinoculadas con hongos micorrícicos antes de ser transplantadas y que no recibieron ninguna aplicación de fungicida, incrementaron su sobrevivencia, crecimiento y su reproducción, en comparación a las que sí se les aplicó. También sugiere regar las plantas periódicamente desde su plantación hasta que el sistema radicular esté totalmente desarrollado y adaptado, comparandolo si es posible con los individuos silvestre de la misma especie.

Se recomienda también (Ecker, 1989), que el sitio de reintroducción deberá estar relativamente inaccesible para que los coleccionistas o los que destruyen la naturaleza, no hagan lo mismo con el trabajo realizado.

II. ANTECEDENTES

II.1 Diversidad de las orquídeas. Las orquídeas pertenecen a la familia Orchidaceae de la clase Monocotyledonae. Son cosmopolitas, crecen en casi todas las altitudes y latitudes, aunque por lo general presentan mayor diversidad en los ambientes tropicales y subtropicales, son perennes y de hábitos terrestres, epífitos, litófitos, semiacuáticos y muy raramente de hábito subterráneo; según la especie tienen dos tipos de crecimiento, simpodial y monopodial. Se estiman entre 20 y 25 mil especies agrupadas en más de 700 géneros (Dressler, 1981). Para México se conocen 918 especies de 144 géneros, de las cuales un 35% son endémicas (Soto, 1988).

Muchas de las especies mexicanas, debido a lo atractivo de sus flores han estado sujetas a colectas exhaustivas, aunado a la alteración y destrucción de los ecosistemas (con la tala y quema de árboles que albergan a las de hábito epífito) se ha contribuido a la erosión genética o disminución de las poblaciones silvestres, lo cual es crítico en las especies endémicas; lo anterior ha ocasionado que un gran número de ellas estén en peligro de desaparecer (I.U.C.N., 1985; Villalobos 1988a; Vovides, 1981, 1988).

II.2 Importancia de las orquídeas. Los atributos estéticos de las orquídeas, expresados en flores de caprichosas formas, vistosos colores, y atractivos aromas (ej. Stanhopea spp., Lycaste spp., Maxillaria spp.), son responsables de la estima que se les tiene como flores de ornato (García y Peña, 1981). Algunas

especies poseen propiedades curativas, atribuidas por nativos americanos (García y Peña, 1981; Schultes, 1990). Todas las especies silvestres forman parte de la complejidad ecológica junto con otros organismos, cabe mencionar que especies de orquídeas han coevolucionado con sus polinizadores, y con algunos hongos establecen asociaciones simbióticas micorrizicas que son de suma importancia para la germinación de semillas y desarrollo de las plantas (Correll, 1950; Burgeff, 1959; Arditti, 1967; Dressler, 1981; Hadley and Pegg, 1989; Wells and Cox, 1989; Schultes, 1990).

II.3. Semillas de orquídeas y la historia de su germinación.

A. Características morfológicas de las semillas de orquídeas. Son muy pequeñas, pesan menos de 15 microgramos y miden de 0.25 a 1.2 mm de longitud por 0.09 a 0.27 mm de ancho. Los frutos producen un gran número de semillas, fluctúan de 1300 a 4,000,000 por cápsula. La mayoría de las especies tienen semillas relativamente indiferenciadas, sin cotiledones o se presenta incipiente, carecen de endospermo. Ante la ausencia del endospermo, al suspensor se le atribuye el papel en la nutrición, que cuando no esta presente es asignado al contacto del saco embrionario con el embrión; el embrión es simple e indiferenciado formado por voluminosas células que almacenan sustancias de reserva y está cubierto por una testa formada de células transparentes, por lo anterior, al embrión de las semillas de orquídeas se le considera en un estadio rudimentario (Correll, 1950; Arditti, 1967; Harrison and Arditti, 1970; Veyret, 1974).

B. Germinación de las semillas de orquídeas. Hasta el siglo XIX se creía que las semillas de orquídeas eran en su mayoría estériles. Las investigaciones realizadas por Bernard en 1899 (Knudson, 1922) y de Burgeff en 1909 (Withner, 1959), permitieron descubrir el papel de la micorriza en la germinación simbiótica de las semillas de orquídeas. Basado en estas investigaciones, Knudson (1922) logró la germinación masiva en forma asimbiótica, a partir del análisis de sus investigaciones demostró qué compuestos orgánicos solubles podían estimular la germinación (Knudson, 1922).

Basandose en la cantidad de semillas que pueden producir las orquídeas por fruto (>1000 y hasta 4 millones), Charles Darwin estimó que si todas las semillas (6200/fruto, 186300/planta) generadas por una planta de Orchis maculata germinaran, crecieran las plántulas y fructificaran, se podría cubrir un acre; y que los descendientes en la cuarta generación de las plantas cubrirían todo el planeta (Arditti, 1966). Sin embargo, lo anterior no se cumple en la naturaleza, debido a que menos del 5% germinan y logran alcanzar el estado adulto (Rao, 1977).

C. Germinación simbiótica. Bernard y Burgeff (Knudson, 1922) demostraron que las semillas de orquídeas para germinar dependen de la infección de un hongo específico, que generalmente vive en las raíces de las orquídeas. Bernard (Burgeff, 1959) consideró que el hongo causante de la infección pertenecía al género Rhizoctonia. Ambos coincidieron en que el inicio de la infección se establecía en el suspensor y la porción basal del embrión, que con el desarrollo de éste, el hongo es digerido o desintegrado (Knudson, 1922; Burgeff, 1959). El cultivar orquídeas por

semillas fue por mucho tiempo desconocido, y eran consideradas estériles. Como resultado de los trabajos de Bernard en 1899 (Knudson, 1922), se estableció el método para germinar semillas (conocido como simbiótico), su investigación consistió en sembrar en tubos de ensaye inoculados con el hongo; encontró que de 15000 intentos, solamente se observó la germinación de unos cientos. Posteriormente, una práctica común era el sembrar semillas sobre musgo húmedo alrededor de una planta de orquídea, sistema utilizado por aficionados en esa época (Arditti, 1967; Harrison and Arditti, 1970).

D. Germinación asimbiótica. En 1916, Knudson (Knudson, 1922) demostró que en la nutrición orgánica de plantas, varios azúcares son muy favorables influyendo sobre el crecimiento, por lo que sugirió que la germinación de semillas de orquídeas podía ser obtenida con el uso de ciertos azúcares.

En 1922, Knudson logró por primera vez la germinación asimbiótica de hasta 100% en semillas del híbrido Laelia Cattleya (orquídea), con la utilización de azúcares (glucosa y fructosa) en un medio nutritivo con sales minerales y extracto orgánico, registrando altos porcentajes de germinación asimbiótica (Knudson, 1922, 1930).

La germinación asimbiótica y el desarrollo in vitro de plantas de orquídeas han sido desde 1922 ampliamente aplicados a otras especies de esta familia y se han enriquecido y mejorado los medios, registrándose mejores sistemas para su propagación (Arditti, 1967, 1977; Arditti and Ernst, 1984; Murashige, 1974; Rao, 1977; George and Serrington, 1984).

II.4 Propagación clonal. En 1960 se inició la historia de la propagación clonal por cultivo de tejidos en plantas superiores, con los estudios realizados por Morel (1974), al utilizar por primera vez tejidos meristemáticos de Cymbidium sp. De esta forma llegó a establecer un sistema de propagación masiva con la formación de masas celulares que denominó cuerpos en forma de protocormos (Protocorm Like Bodies, PLB's), donde cada protocormo asexual, al subcultivarse en medios frescos inductores, presentaba la capacidad de inducir nuevos PLB's por tiempo indefinido, o de regenerar una planta por protocormo en el medio basal adecuado. La utilización de tejidos meristemáticos de Cymbidium sp. también permitió la obtención de plantas libres de virus a partir de plantas contaminadas (Morel, 1974, George and Sherrington, 1984).

II.5 Propagación masiva a partir de tejidos somáticos no meristemáticos. Las investigaciones realizadas por Knudson (1922, 1946) y Morel (1960), han servido de base para explotar con buen éxito la regeneración de plantas de orquídeas a partir de otros explantes como protocormos, ápices de raíz, ápices de tallo, secciones nodales, ápices y bases de hojas, partes florales, meristemas, entre otros (Arditti, 1977; Rao, 1977, George and Sherrington, 1984).

La potencialidad de la micropropagación asexual en orquídeas es analizada por Morel (1974) para el género Cymbidium, tomando en cuenta el establecimiento previo de PLB's originado de la utilización de diversos explantes somáticos, reporta que a partir de un protocormo asexual que se seccione en 4 partes, cada fragmento genera en promedio 8 protocormos, es posible obtener

más de un billón de plantas en solo 9 meses de cultivo. Arditti (1977) utilizando este mismo sistema, indica que apartir de una yema de una planta de Cymbidium se puede obtener 4 millones de plantas/año.

Se puede decir que el cultivo de tejidos en orquídeas es parte fundamental de la historia en la industria de plantas ornamentales. Aunque cabe mencionar que las monocotiledóneas presentan mayor dificultad en su propagación por estas vías en comparación a las dicotiledóneas (Arditti et al., 1982a; George and Sherrington, 1984), no es la excepción la familia de las orquídeas, debido al ciclo de vida largo (>5 años) que se presenta en la naturaleza en mayoría de las especies y a la lenta respuesta morfogénética y de crecimiento de las plantas en condiciones in vitro.

II.6 Análisis poblacional. Algunos estudios de dinámica poblacional, demostraron en el caso de orquídeas terrestres de Europa (ej. Ophrys sphegodes Mill.), que las semillas, al igual que el estadio de protocormo, pueden permanecer años en latencia antes de germinar o emerger del suelo en forma de planta. Además, pueden tardar más de 4 años desde el inicio del surgimiento sobre la superficie del suelo, hasta alcanzar la madurez o floración (Hutchings, 1989). Aunque por cultivo de tejidos se acelera su desarrollo, este viene a ser lento debido al ciclo de vida tan largo que presentan en comparación con otras monocotiledóneas herbáceas, lo que justifica su aplicación para la investigación científica y explotación industrial.

II.7 Aplicación Industrial. El uso de estas técnicas en orquídeas han sido ampliamente utilizadas a nivel comercial, desarrollando diversos sistemas de propagación masiva en muchas especies e híbridos de los géneros: Arachnis, Cattleya, Cymbidium, Dendrobium, Epidendrum, Laelia, Oncidium, Paphiopedilum, Phalaenopsis, Renanthera y Vanda. Estos nuevos métodos de propagación se han establecido en gran medida debido a la importancia que tienen en la producción de flor cortada (Rao, 1977; George and Sherrington, 1984; Sagawa and Kunisaki, 1984). Además de esta presentación, también se explota comercialmente la venta de plántulas en frascos con medio de cultivo (*in vitro*), plantas juveniles y en estados iniciales a la floración desarrolladas en invernadero y plantas de especies silvestres colectadas continuamente en diversos países de Latino América.

Híbridos del género Phalaenopsis en una presentación de 40 plántulas/frasco en condiciones *in vitro* es de \$30.00 hasta \$80.00 us, las cuales son originadas de la germinación asimbiótica.

Para el caso de especies colectadas en el ambiente silvestre, son vendidas por la compañía "BERGSTROM ORCHIDS" (CA. U.S.A.), como Alamania punicea Llave & Lex. (de Méx.), en un precio de \$9.00us/planta y Cattleya aurantiaca (Batem. & Lindl.) P.N.Don. var. alba (de Méx.), en \$12.00us/planta (Anónimo, 1985); algunos híbridos de Paphiopedilum o Vanda en estadio adulto, cultivados en condiciones de invernadero, tienen precios de hasta \$75.00us/planta, vendidas por "STEWART INC. ORCHIDS" (CA. U.S.A.) y "R.F.ORCHIDS" (Florida, U.S.A.) (Anónimo, 1985).

II.8 Avances de investigación in vitro de algunas especies de orquídeas amenazadas. Existen trabajos aunque no tan extensos o profundos en la investigación in vitro, que sirvieron de base, con especies y géneros propagados previamente a la presente investigación, los cuales se enlistan en la tabla B.

TABLA B. ORQUIDEAS PROPAGADAS POR CULTIVO IN VITRO Y RELACIONADAS CON LA PRESENTE INVESTIGACION.

GENERO/ESPECIE	EXPLANTE	TIPO DE CULTIVO	MORFOGENESIS/ PROPAGACION	REFERENCIA
<u>Bletia urbana</u> Dressler	Semillas	Protocormos	Plantas	Chavez, 1980.
<u>B. urbana</u> Dressler	Protocormos	Sección de protocormos	Brotación múltiple	Nartlax, 1985
<u>B. urbana</u> Dressler	Semillas	Protocormos	Plantas*	Rubio et al., 1989.
<u>Rexydia vitellina</u> (Lindl.) Dressler	Semillas	Protocormos	PLB's y plantas	Rubio, 1990.
<u>Laelia</u> sp.	Semillas	Protocormos	Plantas	Arditti, 1967.
<u>L. anceps</u> Lindl.	Tallos de plantas in vitro	Callo	Plantas	Luna, 1982.
<u>Lycaste</u> sp.	Semillas	Protocormos y ápices de tallos	PLB's y plantas	Korel, 1974.
<u>Odontoglossum</u> sp.	Semillas	Protocormos y sección de protocormos	PLB's y plantas	Korel, 1974.
<u>O. grande</u> Lindl.**	Semillas	Protocormos		Arditti and Ernst, 1984.
<u>O. schlieperiana</u> Reichb.**	Semillas	Protocormos		Arditti and Ernst, 1984.
<u>Oncidium</u> sp.	Semillas	Protocormos	Plantas	Rao, 1977.
<u>O. varicosum</u> Lindl.	Raíz	Apice de raíz	PLB's y plantas	Kerbanz, 1984.

(*)= con la adaptación en invernadero y reintroducción en el habitat natural.

(**)= especies de Sud América, separadas recientemente de las del Norte y Centro América, ex género Leuboglossum (Halbinger, 1984).

III. OBJETIVOS

1) Modificar medios nutritivos que permitieran un mejor resultado de las diferentes etapas de desarrollo in vitro, fundamentando la investigación con una revisión bibliográfica del cultivo asimbiótico en orquídeas, innovando y acoplando a las condiciones que se tenían para su realización.

2) Establecer sistemas de propagación masiva in vitro de especies de orquídeas endémicas de México y especies que además presentan una distribución hasta Centro América (tabla A).

3) Rescatar in vitro especies de orquídeas silvestres amenazadas de extinción, propagadas en el laboratorio.

4) Establecer los principios de un banco in vitro de especies de orquídeas amenazadas de extinción para el desarrollo de nuevas estrategias de propagación masiva de futuras investigaciones.

5) Recuperar poblaciones de orquídeas amenazadas, reintroduciéndolas en el habitat natural, con un seguimiento de su desarrollo hasta estados juveniles (2-4 años después de su liberación).

6) Propagar en forma masiva bajo condiciones in vitro y reintroducir en el habitat natural plantas de Lycaste skinneri (Batem. ex Lindl.) Lindl. var. skinneri, especie de orquídea que habita para México en el bosque mesófilo de montaña del Estado de Chiapas, la cual era común en esta localidad y debido

principalmente a colectas exhaustivas de que ha sido objeto se le cataloga en peligro de extinción (reportada en el apéndice 1 del CITES). Apoyando esta investigación con los resultados en forma simultánea de Lycaste aromatica (Graham ex Hooker) Lindl., especie colectada en ambientes similares y con afinidad taxonómica y de hábito epífita-terrestre . Sin embargo, aunque tiene una amplia distribución es considerada en la categoría de vulnerable (tabla A).

7) Propagar en forma masiva bajo condiciones in vitro y reintroducir en el habitat natural plantas de Oncidium stramineum (Lindl.) Batem., especie endémica localizada en el centro del estado Veracruz, que debido al habitat restringido y a la perturbación del ecosistema donde crece, se ha catalogado en peligro de extinción.

8) Desarrollar nuevas líneas de investigación (efecto del GA , BA y ANA en el crecimiento y formación de raíz de brotes) en Bletia urbana Dressler, especie con antecedentes de propagación (tabla B): establecimiento de la germinación asimbiótica, cultivo de tejidos (brotación múltiple) a partir de secciones de protocormos y liberación de plantas en su habitat natural obtenidas por estas técnicas.

9) Propagación (germinación asimbiótica y desarrollo hasta estadios de plántulas) de otras especies de orquídeas (tabla 2) con diferentes status de alteración, utilizando la metodología establecida en las especies anteriormente mencionadas (6), 7), 8)), con el fin de mostrar la potencialidad de los medios

nutritivos generados, además de iniciar su recuperación in vitro y en un futuro cercano o cuando se requiera, reintroducir a cada una de ellas en sus respectivos habitats naturales o desarrollar investigaciones de diversa índole que se desee (ej. inducción de micorrizas, estudios anatómicos, establecimiento de nuevas líneas de propagación masiva y crecimiento in vitro, estudios de metabolitos secundarios en orquídeas y fisiológicos en general).

IV. MATERIALES Y METODOS

IV. 1 Material biológico.

El material inicial fundamental fueron semillas de orquídeas amenazadas de extinción (tabla 2), utilizando frutos aún no dehiscentes y semillas liberadas de los frutos, estas últimas, almacenadas en frascos sujetos a temperaturas 4°-8°C, obscuridad y baja humedad relativa (utilizando sal de cloruro de calcio anhidro). Los lugares de colecta fueron en los estados de Chiapas, Oaxaca y Veracruz (tabla 2), con excepción de las semillas de Bletia urbana Dressler, las cuales se obtuvieron de poblaciones en el Pedregal de San Angel D.F. y se almacenaron (durante 6 años) en frascos bajo las mismas condiciones antes mencionadas. Las semillas de frutos aun no dehiscentes, fueron el resultado de la colecta en campo, de plantas con frutos y de la polinización artificial realizada en invernadero. Las semillas maduras fueron obtenidas de frutos dehiscentes colectados en campo o directamente de las flores polinizadas en invernadero (tabla 2).

A. Almacenamiento de semillas.

Algunos frutos aun no dehiscentes (cápsulas verdes) colectados en campo se envolvieron en papel húmedo, conservándolos en lugar fresco (20 a 25°C) durante la transportación al laboratorio, para ser sembradas todas las semillas en el cultivo asimbiótico.

Los frutos maduros (dehiscentes), se almacenaron en un

lugar fresco y seco (15' a 20°C), dentro de una bolsa de papel hasta que liberaron la totalidad de las semillas.

Los frutos que iniciaban la dehiscencia, se abrieron, se retiraron las semillas con una espátula y se guardaron en bolsas de papel, en un lugar fresco y seco durante aproximadamente 1 semana, con el propósito de que disminuyera la humedad de las semillas antes de ser almacenadas. Además, de etiquetar debidamente cada uno de los sobres con semillas, anotando los datos del nombre de la especie, número de fruto y de planta, tipo de polinización (autopolinización, polinización cruzada o natural (desconocida)) número de colecta, origen, habitat, habito, lugar y fecha de colecta, época de floración y observaciones, se procedió a guardarlos de la misma forma inicialmente descrita.

IV. 2 Medios nutritivos para el cultivo in vitro de orquídeas.

A. Germinación asimbiótica. Para la exploración de la germinación en orquídeas se utilizaron semillas de frutos aún no dehiscentes de L. skinneri var. skinneri, empleando 3 tipos de medios nutritivos (tabla 1): 1) Knudson "C" (KC) (Knudson, 1946; ver apéndice 1); 2) Vacin y Went (VW) (Knudson, 1951; apéndice 2) y 3) Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962; apéndice 3), con diferentes modificaciones como la adición de fitoreguladores del crecimiento: 1 μM ANA, 5 μM BA y 5 μM de GA₃; reducción al 50% de la concentración de las sales minerales (ver tabla 1); enriquecimiento del medio Knudson "C" (KC-E) con una fuente de micronutrientes minerales y vitaminas del medio B5 (Gamborg et al., 1968) y adición de sacarosa al 2 y 3% (tabla 1).

En las siembras posteriores de semillas de L. skinneri var.

skinneri y otras especies trabajadas (tabla 2), se utilizó el medio KC-E (apéndice 4).

Para la preparación de los medios KC, KC-E, VW y MS, se hicieron soluciones concentradas (apéndices: 1, 2, 3 y 4). Las sales de calcio y hierro para los medios KC y VW, se pesaron en el momento de realizar el medio nutritivo, debido a que sus soluciones concentradas al ser almacenadas se precipitan.

Se utilizaron frascos de 125 ml y matraces erlenmeyer de 250 ml con 25 y 40 ml de medio nutritivo respectivamente.

B. Cultivos en suspensión de protocormos y de PLB's de Q. atramineum. Para el desarrollo de PLB's a partir de protocormos, se utilizaron matraces erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio KC-E líquido con 0 (control) y 10 μ M de BA, a pH de 5.0 (figura 1 B y C). En la proliferación continua de PLB's se realizaron subcultivos en medios de la misma composición, con ciclos de subcultivo de 3 a 4 meses. Para inducir el desarrollo de brotación múltiple, los PLB's se subcultivaron a frascos de 125 ml con 25 ml de medio sólido KC-E + agua de coco (10% v/v) para ambas combinaciones (0 y 10 μ M de BA); (figura 1 C y D).

C. Cultivo de brotes de B. urbana. Se utilizaron brotes de 20 mm, obtenidos por Martínez (1985) en el desarrollo de la brotación múltiple a partir de secciones de protocormos. Los brotes se sembraron en tubos de ensaye de 2.5 cm de diámetro por 15 cm de largo con 12 ml de medio nutritivo KC-E (apéndice 4) como medio básico a pH 5.3, se establecieron 12 combinaciones posibles con GA₃ (0 y 5 μ M), (BA 0 y 5 μ M) y (ANA 0, 1 y 5 μ M); (apéndice 5: tratamientos A a L). Además se estableció otro

tratamiento con medio básico a pH 5.0 (apéndice 5: tratamiento H).

D. Medio de cultivo para el desarrollo de plantas in vitro de L. skinneri var. skinneri. Se utilizó el medio KC y se enriqueció con extractos orgánicos, tales como: agua de coco (endospermo líquido), extracto de plátano y extracto de nopal (apéndice 6A), para el desarrollo de diferentes tratamientos. Para permitir el crecimiento de las plántulas a tallas de 10-15 cm, se utilizaron frascos de boca ancha de 500 y 1000 ml de capacidad con 100 y 200 ml de medio respectivamente.

E. Elaboración de los medios de cultivo. Se llevaron a cabo los siguientes pasos: 1) elaboración de las soluciones concentradas (sols. stock) y/o pesaje de los componentes del medio (apéndices 1 a 4), 2). A un vaso de precipitados de la capacidad necesaria se agregó el 30 o 40% de agua destilada del volumen total a preparar y se colocó en una parrilla de agitación para la disolución de los componentes al ir adicionándolos, 3) se mezclaron las sales o los nutrimentos minerales en el orden en que se indica en los apéndices 1 a 4: a) macronutrimentos, b) fuente de calcio, c) fuente de hierro, y d) micronutrimentos. 4) Los componentes orgánicos: a) inositol, b) vitaminas, c) aminoácidos, d) fitohormonas, e) sacarosa y f) extracto orgánico (apéndice 1, 2, 3, 4 y 6A), 5) posteriormente se aforó el medio con agua destilada, 6) se midió el pH y se ajustó con KOH y/o HCl a 0.1 y/o 0.5 N., 7) para el caso de los medios líquidos, éste se agregó a los matraces Erlenmeyer de cultivo, se taparon con papel aluminio y se sujetaron con ligas para esterilizarlos en el autoclave. En los medios sólidos después de medir el pH se

adicionó el agar, agitando constantemente y calentandolo para disolverlo (hasta inicio de ebullición). Posteriormente se agregó el medio en los frascos y/o tubos de ensaye y/o matraces Erlenmeyer, se taparon con papel aluminio y se sujetaron con ligas de hule y se esterilizaron en el autoclave. Para el caso de la utilización de fitohormonas termolábiles (ver apéndice 6), el medio se esterilizó en un matraz Erlenmeyer de mayor capacidad que la cantidad de medio preparado, para evitar que se derramara dentro del autoclave al ser esterilizado, para este medio se esterilizaron los frascos o tubos de ensaye previamente. También se esterilizó el filtro millipore con membrana de 0.45 micras de porosidad. El material ya esterilizado (medio de cultivo, frascos o tubos de ensaye, filtro, etc.) se trasladó a la campana de flujo laminar (zona aséptica). Se limpiaron cuidadosamente con alcohol todas las superficies externas del material conforme se colocaban dentro de la campana. Se dejó enfriar el medio nutritivo aproximadamente a 60°C cuando aún está líquido y podía fácilmente agitarse para incorporar la fitohormona. Esta previamente se había esterilizado por filtración y se adicionó al medio, agitando con ayuda de una varilla de vidrio para homogenizar la solución, después se agregó a los frascos o tubos estériles.

Todo el material se esterilizó en el autoclave a 1.4 Kg/cm² (20 Lb/pulg²) durante 15 minutos.

IV. 3 Procedimiento de Siembra en Condiciones de Asepsia.

La siembra de semillas in vitro, subcultivo de protocormos y subcultivo de plantas in vitro (ver figura 1), se llevó a cabo en

condiciones de asepsia, en una campana de flujo laminar horizontal. Esta se hizo funcionar 30 minutos antes de iniciar cualquier maniobra de sembrado, se limpió utilizando alcohol etílico de 96%, asimismo se procedió con el instrumental, con la superficie externa de los frascos a sembrar, al igual que manos y antebrazos del usuario, esto permitió garantizar que dentro del medio de cultivo no se desarrollaran bacterias y/u hongos. El instrumental, espátulas, pinzas, agujas de disección, etc., se mantuvieron dentro de un frasco con etanol 96% flameandolos antes de utilizarlos.

Para destapar los frascos con medio esterilizado y sembrarlos en la campana de flujo laminar, primero se limpiaron con un algodón con alcohol a 96%, se flameó con ayuda del mechero toda la superficie de unión entre el frasco y la tapa, se retiró momentáneamente el papel aluminio o la tapa del frasco, se introdujo el explante o material biológico a cultivar in vitro y se selló nuevamente. Una vez sembrado se incubó en la cámara de cultivo.

IV. 4 Siembra y subcultivo de semillas y otros explantes.

A. Semillas almacenadas, fueron desinfectadas superficialmente en un vidrio de reloj, con una solución al 7% de hipoclorito de calcio $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ (Knudson, 1948) durante 30 minutos dentro de la campana de flujo laminar, agitando a intervalos con una aguja de disección para romper la tensión superficial y asegurar de esta manera la esterilización superficial. Posteriormente con una jeringa estéril se extrajo toda la solución desinfectante y con otra se lavaron las semillas dos veces con agua destilada esterilizada y con una tercera jeringa

estéril se retiró el agua en las dos ocasiones, con el fin de eliminar la solución desinfectante y evitar que afectara o interfiriera en la germinación de las semillas (Martínez, 1985).

Una vez que las semillas fueron desinfectadas se tomaron con una espátula y se depositaron en los matraces o frascos germinadores con medio nutritivo.

B. Semillas de frutos aun no dehiscentes. Los frutos o cápsulas verdes se desinfectaron superficialmente en los siguientes pasos: a) se lavaron con jabón y agua corriente, b) se desinfectaron en alcohol a 70% durante 2 minutos, agitando dentro de un vaso de precipitados en una parrilla de agitación, retirando el alcohol al término del tiempo, c) se agregó una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) de uso doméstico (cloralex) al 50% (3% de cloro activo). Se adicionaron unas gotas de tween 80, se tapó el vaso de precipitados con papel aluminio y se agitó durante 20 minutos. Posteriormente en la campana de flujo laminar, se limpió con alcohol 96% y se flameó la tapa de aluminio. Por otro lado se extrajo el fruto con pinzas de disección y se introdujo en agua destilada esterilizada de 3 a 5 minutos, al término del cual se abrió el fruto longitudinalmente en dos partes en una caja de petri con bisturí y pinzas de disección, se extrajeron las semillas con una espátula y se sembraron en los frascos de cultivo. Para establecer el porcentaje de germinación se sembraron de 50 a 75 semillas por frasco, se contaron las semillas germinadas (protocormos) y las que no lo lograron, esto se detectó con un microscópio estereoscópico; además se registró el tiempo de

germinación por siembra, fruto y especie.

C. Propagación masiva in vitro a partir del cultivo en suspensión de protocormos de Q. stramineum. Protocormos provenientes de la germinación asimbiótica de Q. stramineum (tabla 2, figura 1 B) se sujetaron a cultivo en medio líquido KC-E (apéndice 4); (control) y medio KC-E más 10µM de BA.

Para la siembra se utilizaron protocormos de 2 meses de edad y de 1 a 1.5 mm de diámetro, se sembraron un promedio de 200 protocormos por matraz con 2 repeticiones por combinación, se etiquetaron y se incubaron sobre una mesa de agitación a 100 r.p.m., durante 3 meses (figura 1 C) para la formación de PLB's, estos se subcultivaron en nuevos medios de igual composición al inicial. Para estimular la brotación múltiple en los PLB's, estos se subcultivaron en medio sólido KC-E más agua de coco (10% v/v) y utilizando frascos de 125 ml. Se sembraron 4 PLB's por frasco (figura 1 D, tabla 3).

E. El efecto de fitohormonas en brotes de B. urbana (20 mm de longitud). Los brotes provenientes de la brotación múltiple de protocormos seccionados (material obtenido del trabajo realizado por Martínez, 1985), fueron separados con un bisturí y sembrados, un brote por cada tubo de ensaye con 12 repeticiones por cada tratamiento, utilizando 13 tratamientos en las combinaciones de BA, GA₃ y ANA de acuerdo al apéndice 5. Se registró la longitud del brote (tabla 4) y de las raíces (tabla 5), para lo cual las plantas fueron extraídas de los tubos de ensaye de cultivo a las 7 semanas de incubación.

D. El desarrollo de plántulas in vitro, se estableció con plántulas de L. skinneri var. skinneri de aproximadamente 30 mm

de largo (figura 1 E y H). Se sembraron 20 plántulas por frasco con dos repeticiones, sumando 60 plántulas por tratamiento. La longitud de las plantas de 3 cm de largo de *L. skinneri* var. *skinneri* se tomó de la unión de la raíz con el tallo (corona) al ápice de la hoja más alta, el desarrollo de raíz se clasificó de la siguiente manera: (-) ausencia; (+) incipiente, de 0.1 a 3 cm; (++) bueno, de 3.1 cm a 10 cm, con hasta 4 raíces; y (+++) muy bueno, más de 10 cm.

IV. 5 Métodos Estadísticos.

A los datos obtenidos del desarrollo de plantas de *B. urbana*, a partir de brotes cultivados en KC más un barrido de fitohormonas (apéndice 5), se les sometió a un análisis de varianza y análisis de intervalo múltiple de Duncan y Tukey (realizado mediante el paquete estadístico SPSS del centro de cómputo de la UNAM), para encontrar el mejor tratamiento en el incremento del brote y formación de raíz.

IV. 6 Condiciones de incubación.

Después de la siembra los diferentes cultivos se mantuvieron en una cámara de incubación a $28 \pm 3^\circ\text{C}$.

En la exploración de la germinación se utilizaron diferentes regímenes: A) fotoperiodo 16 h luz (500 lux)- 8 h oscuridad; B) oscuridad continua, C) luz continua (1000 lux), D) luz indirecta natural, con su mayor intensidad (1000 lux) de las 10:00 a las 15:00 hrs del día.

Los protocormos de *O. stramineum* cultivados en medio líquido, se incubaron sobre una parrilla de agitación (100 r.p.m.), 16 h luz (300 a 500 lux)- 8 h oscuridad.

Para el desarrollo de los brotes de B. urbana se incubaron a fotoperíodo de 16 h luz (1000 lux)- 8 h oscuridad.

Desarrollo de las plantas in vitro: fotoperíodo 16 h luz (1500 lux)- 8 h oscuridad.

IV. 7 Aclimatación de plantas en condiciones de invernadero.

Las plantas desarrolladas in vitro con una talla de 8 cm o más de longitud, fueron llevadas a condiciones de invernadero (figura 1 H, I), para tal efecto se establecieron los siguientes pasos: a) se preparó una mezcla 1:1 de tierra de hoja y agrolita esterilizada previamente en autoclave, b) la mezcla se depositó en charolas de plástico (25x40 cm x 8 cm de altura), fijando en sus esquinas estacas de 25 cm de largo para cubrir la charola con plástico de polietileno transparente y formar un polígono rectangular (25x40 cm x 25 cm de altura). Esto con el fin de mantener un microclima con alta humedad relativa; c) las plantas se lavaron con agua corriente eliminando los residuos de agar adheridos a las raíces. Posteriormente, las plantas de L. skinneri var. skinneri y L. aromatica se plantaron en hileras (3 cm entre planta y planta), sembrando 96 plantas por charola, se regaron y se taparon con el plástico y se fijaron con ligas de hule para evitar en un principio la pérdida de humedad; d) se colocaron dentro del invernadero, permaneciendo en estas condiciones por 3 o 4 semanas; después, se les retiró el plástico y se mantuvieron en condiciones de alta humedad atmosférica del invernadero, por un tiempo de 3 meses. Posteriormente las plantas fueron transportadas al hábitat natural.

IV. 8 Reintroducción de plantas a los habitats naturales.

Después de una aclimatación en invernadero (figura 1 H → I → J), las plantas de Lycaste skinneri var. skinneri y Lycaste aromatica, un total de 2403 y 1188 respectivamente, fueron reintroducidas en julio de 1988 (a partir semillas germinadas el 12 de octubre de 1985 y 29 de junio de 1986 respectivamente para las especies antes mencionadas) (tabla 7) en el "Parque Nacional Lagos de Montebello" (bosque mesófilo de montaña), en el Estado de Chiapas. Las plantas se transportaron envueltas en papel periódico húmedo y dentro de bolsas de plástico, con el fin de ahorrar espacio. Se procuró mantenerlas a la sombra, a 20-25°C. Ambas especies se plantaron en troncos caídos, en ramas principales de encino que acumulaban materia orgánica y en rocas con abundante sustrato orgánico.

Las plantas de Oncidium stramineum se pasaron directamente de las condiciones in vitro al campo (figura 1 H → J), sin pasar por una aclimatación en invernadero. Se liberaron un total de 700 plantas en su habitat natural (bosque de encino) en Huatusco, Veracruz, en 3 fechas distintas: en abril y julio de 1987 y julio de 1988 (tabla 8). Las plantas se sujetaron a ramas lisas, carentes de la acumulación de materia orgánica y se sostuvieron con tiras de tela de algodón.

V. RESULTADOS Y DISCUSION.

Para la presente investigación el material biológico inicial fueron semillas de frutos aún no dehiscentes (semillas dentro de la cápsula) y semillas maduras de frutos ya dehiscentes (ver tabla 2). La utilización de semillas fue conveniente debida a varios factores, los más importantes: a) generalmente son escasas las fuentes de explantes somáticos de las orquídeas, más aún en aquellas en peligro de extinción, b) la gran variabilidad genética que nos proporciona la reproducción sexual (Poehlman, 1983), de suma importancia para recuperar poblaciones y no individuos idénticos con la clonación y c) la utilización de semillas almacenadas adecuadamente y semillas de frutos o cápsulas verdes aún no dehiscentes, debido a que se reportan buenos resultados en uno y otro estado fisiológico, se ha observado que las diferencias en respuesta dependen de las especies, del hábito terrestre o epífita y de las condiciones ambientales de germinación, fotoperíodo: horas luz u oscuridad continúa, fitohormonas, tipo de medio nutritivo, temperatura (Arditti, 1967; Arditti *et al.*, 1981, 1982a, 1982b, 1985; Oliva and Arditti, 1984).

El sistema de almacenamiento de las semillas de *B. urbana* Dressler a temperatura 4-8°C por más de 6 años, en donde se presentó alto porcentaje de germinación asimbiótica, sirvió de modelo para las otras especies trabajadas (tabla 2), Arditti (1967) reportó este sistema de almacenamiento de semillas de orquídeas que en algunas especies se mantuvieron viables por 18

años, aunque también indica que algunas especies pueden perder su viabilidad en unas cuantas semanas de almacenamiento.

Para el caso de los frutos verdes (aún no dehiscentes) colectados en campo, que fueron sembrados después de 4-6 días de su cseparación de la planta madre, se registró en algunos 90 y 100% de germinación asimbiótica, tal es el caso de algunos frutos de las especies de Laelia anceps Lindl. Lemboglossum ehrenbergii (Link, Kl. & Otto) Halbinger, Oncidium stramineum (Lindl.) Batem. y Rhynchoaelia glauca (Lindl.) Schltr. (tabla 2); cuando el tiempo fué mayor de 10 días separados de la planta donadora, manifestaron notorios cambios de deshidratación, lo que probablemente repercute en la germinación de las semillas.

V.1 Germinación asimbiótica de semillas de Lycaste skinneri (Batem. ex Lindl.) Lindl., var. skinneri.

Se utilizó un fruto aún no dehiscente colectado en campo, para la siembra se emplearon diferentes medios nutritivos, fitohormonas, etc. (tabla 1). Los resultados obtenidos en medios básicos KC y VW no mostraron diferencias dando ambos un buen porcentaje de germinación (50%). Estos medios son dos de los más utilizados para tal fin (Arditti, 1967, 1977; Morel, 1974; Rao, 1977; Murashige, 1974; Hartmann and Kester, 1983).

La respuesta en el medio Murashige y Skoog (MS) fue de un porcentaje de germinación menor a 10% (tabla 1), debido a que es uno de los medios con más altas concentraciones de nutrimentos minerales actuando probablemente de una forma inhibitoria en la germinación de las semillas de L. skinneri var. skinneri, llegando incluso a necrosar al 100% de los protocormos (semillas germinadas) a los 4 meses después de la germinación. El medio MS

es rico en sales y fue desarrollado para producir un crecimiento máximo de callo de tabaco, pero para ciertos tipos de tejidos es posible que represente una concentración de sales muy elevadas (Hartmann and Kester, 1983). Las observaciones se pudieron confirmar con los resultados obtenidos en el medio MS modificado con la reducción de las sales minerales a la mitad de la concentración original (tabla 1), habiéndose obtenido hasta un 60% de germinación, superior aún a lo registrado en los medios KC y VW.

V.2 Efecto de los reguladores del crecimiento en la germinación de semillas de *L. skinneri* var. *skinneri*. El GA₃, ANA y BA, han sido reportados como aceleradores o activadores de la germinación en especies hortícolas e incluso en algunos trabajos con semillas de orquídeas (Arditti *et al.*, 1981; Arditti and Ernst, 1984; Flamée, 1978; Hartmann and Kester, 1983; Strauss and Reisinger, 1976; Weaver, 1976), sin embargo para esta especie resultaron ser inhibitorios a las concentraciones utilizadas (tabla 1), como se puede observar en los porcentajes de germinación, ya que en el mejor de los casos no sobrepasaron el 30%. Estos resultados son comparables a los reportados en varios trabajos, donde los reguladores del crecimiento en lugar de favorecer, redujeron la germinación (Arditti, 1967; Arditti *et al.*, 1981), llegando a ser incluso difícil de predecir su acción y siendo influida por factores como la presencia o ausencia de luz para incrementar o disminuir la germinación de las semillas (Arditti *et al.*, 1981). Por lo general, de acuerdo al análisis de los reportes bibliográficos, las auxinas, citocininas y

giberelinas su acción es inconsistente y por lo tanto no concluyente (Arditti, 1967; Arditti and Ernst, 1984; Withner, 1959, 1974). La razón de resultados inconsistentes, Arditti and Ernst (1984), lo atribuyen a 6 factores: (1) puede existir una interacción al combinar varias hormonas o sustancias o con las condiciones de cultivo, (2) formas diferentes y análogas de las hormonas que son usadas, (3) las condiciones de cultivo pueden ser diferentes en cada caso, (4) un amplio rango de las concentraciones de dosis son usadas, (5) respuestas fisiológicas y requerimientos entre especies y géneros pueden variar y (6) la edad de las plántulas germinadas in vitro puede afectar su respuesta.

V.3 Enriquecimiento del medio basal Knudson "C" (KC). Este medio, debido a que es muy simple, carente de varios micronutrientes y de un complejo vitamínico, se enriqueció con ambas fuentes (apéndice 4), siendo entonces denominando KC-E. El cual dió excelentes resultados en la germinación de las semillas de frutos aún no dehiscentes de L. skinneri var. skinneri, obteniéndose entre 90% y 100% de germinación (tabla 1). La utilización de las vitaminas en la germinación de semillas juega un papel muy importante, Miller (1981) informa que los embriones de las plantas son en parte heterotrofos con respecto a ciertas vitaminas, tal afirmación se basa en el hecho que el embrión depende de los cotiledones en cuanto a la tiamina y no crecerá si no se adicionan al medio cantidades apropiadas de vitaminas, ya que en el ciclo vital normal de las plantas verdes, la tiamina se sintetiza en las hojas y se almacena en los cotiledones de las semillas. Para las semillas de orquídeas por

carecer de cotiledones y de endospermo (Arditti et al., 1981), se sugiere que un compuesto específico, posiblemente una vitamina o precursor o derivados de los mismos, puede ser la contribución del hongo, para la germinación asimbiótica (Arditti, 1967). Se tienen evidencias de algunos casos, donde las semillas no han germinado en presencia de azúcar sin la adición de vitaminas o de un extracto fungal. La deficiencia de vitaminas puede llegar a ser una limitante en la germinación de semillas de orquídeas (Noogle and Wynd, 1943; Arditti, 1967), aunque también existen reportes de germinación sin que estén presentes las vitaminas, el cual puede deberse a que las sales minerales, el agar y la sacarosa, pueden presentar en forma de impurezas pequeñas cantidades de vitaminas y otros compuestos en concentraciones adecuadas o requeridas por los tejidos o plántulas, enmascarando de esta manera su necesidad o efecto real. Un número de investigadores han reportado que la tiamina mejora la germinación y crecimiento en orquídeas (Arditti, 1967; Arditti and Ernst, 1984; Arditti and Harrison, 1977; Withner, 1974). Se ha encontrado que las sales minerales y las vitaminas aceleran la germinación de las semillas de Malus sp., Rosaceae (Raghavan, 1977). Los micronutrientes no siempre están incluidos en medios para la germinación de semillas de orquídeas, debido a que pueden encontrarse presentes en cantidades suficientes en los azúcares, agar y sales minerales. Sin embargo, se ha reportado que la adición al medio nutritivo de micronutrientes como: cobalto, boro, yodo, cobre, manganeso y molibdeno han mejorado el crecimiento de plántulas germinadas in vitro. Por lo tanto, la

adición de micronutrientes es usada bajo el supuesto de que no daña a la planta y sí podría ser benéfico en concentraciones apropiadas (Arditti and Ernst, 1984; Harrison and Arditti, 1970; Thompson, 1977). También se sabe que las sales minerales, sacarosa y agar, actualmente son más puros que los reactivos usados hasta la década de los setenta (Miller, 1981). Esto aconsejaría no aventurarse en utilizar los medios sin micronutrientes, que podrían ser de suma importancia en la morfogénesis in vitro, con la precaución de no aplicarlos a concentraciones altas para evitar una inhibición.

V.4 Tiempo de germinación de semillas de L. skinneri var. skinneri. No se observó una diferencia en el tiempo de germinación (tabla 1), y el criterio utilizado fue el hinchamiento muy notable de la semilla (establecimiento de los primeros estadios de protocormo), presentandose a los 45 días en forma homogénea. Únicamente en el tratamiento con MS existió un retraso de 5 días (tabla 1); estos resultados fueron similares a los obtenidos con semillas de otros frutos de la misma especie germinadas en medio KC-E (tabla 1 y 2).

V.5 Condiciones de luz. No se registró una diferencia notable en los porcentajes de germinación de las semillas inmaduras de L. skinneri var. skinneri sometidas a distintos tratamientos (tabla 1). Sin embargo, se observó una diferencia en la coloración de los protocormos, siendo de color verde los expuestos a la luz y blanco amarillento aquellos sujetos a obscuridad continua, debido probablemente a la falta de pigmentos porfirínicos que requieren de luz para su síntesis (Bidwell, 1979). Se utilizaron diferentes condiciones de luz, debido a que

se reporta que algunas especies epífitas de orquídeas pueden germinar en luz y/u oscuridad, pero se ha observado que algunas de hábito terrestre, requieren de oscuridad para germinar (Arditti and Ernst, 1984; Harvais, 1973; Stoutamire, 1974).

V.6 Germinación asimbiótica de semillas de orquídeas en medio KC-E. Ya establecido el medio KC-E y las condiciones ambientales adecuadas para la germinación asimbiótica de semillas de *M. skinneri* var. *skinneri* (tabla 1), se generalizó la utilización de estas condiciones con las otras especies aquí estudiadas (tabla 2). En *B. urbana* donde se utilizaron semillas de dos frutos de la misma fecha de colecta y con aproximadamente 6 años de almacenamiento a temperatura 4-8°C; en las semillas del fruto 1 se registró un 100% de germinación asimbiótica a los 6 días, mientras que para el fruto 2 fue nula después de 3 meses de incubación (tabla 2). Este efecto probablemente se debió a la latencia en que pudieron entrar las semillas, a la pérdida de viabilidad, o a la posible malformación de las semillas del fruto 2, en ambos casos provienen de frutos autopolinizados, y se carece de estudios anatómicos, fisiológicos y bioquímicos que permitan analizar la ausencia o pérdida de la germinación que se presenta en las semillas de orquídeas.

A. Utilización de semillas almacenadas y de cápsulas verdes. Los resultados de la germinación de semillas de los distintos frutos (tabla 2), muestran que es necesario investigar más detalladamente el desarrollo de los embriones dentro de los frutos; además, es necesario un mayor número de registros de porcentajes de viabilidad por tiempo de almacenamiento de las

semillas ya que los resultados obtenidos de un mismo estadio (semillas de frutos aun no dehiscentes o semillas almacenadas) registraron resultados muy diversos, debido probablemente a las distintas etapa de desarrollo en que se encontraban los embriones o al tiempo y condiciones de almacenamiento de las semillas. Un ejemplo claro se presentó en L. skinneri var. skinneri (tabla 2), en el cual varió el porcentaje de germinación, llegando a ser nulo en el fruto 4 (tabla 2), en el cual se considera que las semillas estaban en un estadio muy avanzado, pues al abrir el fruto, las semillas se separaban fácilmente unas de otras (en contraste a los más inmaduros donde las semillas estaban agrupadas y muy hidratadas); esto indicó poca humedad y que el fruto de color verde amarillento se abriría (dehiscencia) en pocos días. La falta de respuesta se pudo deber a varias causas, entre ellas: a) al "stress" que pudo haber tenido la planta durante el desarrollo del fruto (en la estación invernal), debido a la falta en el control del riego en el invernadero, b) a las altas temperaturas e intensidades luminosas que prevalecían en el invernadero. c) al posible desarrollo anormal o aborto de los embriones en las semillas por provenir de una flor autopolinizada, lo cual sugiere la existencia de barreras pre o post-cigótica que pudo generarse para este fruto, siendo posiblemente el mismo caso del fruto 2 de B. urbana; d) al manejo no muy adecuado que pudieron haber tenido los sobres con semillas durante el tiempo de almacenamiento como la posible hidratación y a la elevación de temperatura (>25°C) que en repetidas ocasiones se extrajo semillas del sobre para ser sembradas asimbióticamente. Los resultados de los frutos autopolinizados

contrastan con el fruto número 2 de L. skinneri var. alba (tabla 2), obtenido de polinización y desarrollo en condiciones naturales in situ. Su apariencia y su morfología antes de la siembra de las semillas era posiblemente de máximo desarrollo con una coloración verde, sin el clásico matiz verde-amarillento que se manifiesta con la cercana iniciación de la dehiscencia. Lo anterior muestra que se necesita conocer más sobre la fisiología de la germinación en las semillas de orquídeas, con énfasis en la posible pérdida de viabilidad y/o la probable entrada en latencia durante la maduración de las semillas y en su almacenaje (Arditti et al., 1982a); además de estudiar las condiciones de cultivo adecuadas a las plantas y evitar una sobreproducción de frutos por planta que puede ocasionar un consecuente desarrollo anormal de estos. Esto se sugiere pues se observó que en una planta de L. skinneri var. skinneri ocurrió la necrosis del pedúnculo de algunos de los frutos cuando fueron polinizadas más de 3 flores, fenómeno debido probablemente a una sobre demanda de nutrimentos por los frutos, dando como resultado la suspensión de la nutrición de algunos frutos. Esto posiblemente es una consecuencia de que las condiciones de cultivo no le permitieron a la planta, soportar el desgaste energético que significaba generar más de 3 frutos.

Se observó una disminución en el tiempo de germinación de las semillas inmaduras y pudo deberse a que en este estadio la cubierta de la semilla esta hidratada, lo que probablemente le confiere una mayor permeabilidad a la entrada de los nutrimentos para activar la germinación de forma inmediata o permite

continuar el desarrollo de los embriones recién formados, además de una posible ausencia de inhibidores de la germinación en este estadio.

V.7 Propagación masiva de Oncidium stramineum (Lindl.) Batem., a partir de protocormos cultivados en medio líquido. De los protocormos de O. stramineum obtenidos de la germinación asimbiótica (tabla 2; figura 1 B), después de dos meses de la germinación, una parte se utilizó para el desarrollo a plantas (figura 1 BE) y la otra se le sujetó a cultivo en suspensión en medio líquido KC-E (apéndice 4; figura 1 BC) con dos tratamientos: 0 y 10 μ M de BA. En ambos casos los protocormos se desarrollaron en diámetro de 1-1.5 mm a 7 mm en promedio, respondieron favorablemente 92% el control y 90% con 10 μ M BA, necrosándose menos del 10%, durante 3 meses de cultivo en suspensión a 100 r.p.m. En este estadio de 7 mm en lugar de continuar su crecimiento en diámetro, se observó un incremento en el número, lo cual mostró la potencialidad de propagación continua, a estas estructuras se les ha llamado cuerpos en forma de protocormos ("Protocorm Like Bodies", PLB's). Los PLB's al final de cada subcultivo en suspensión (3 a 4 meses) presentaban una coloración amarillenta y el medio de cultivo se había tornado de color obscuro.

A. Formación de Brotación Múltiple en PLB's de O. stramineum. Se tomó una muestra al azar de PLB's a los 3 meses de iniciado el cultivo en suspensión, 36 PLB's por tratamiento (0 y 10 μ M de BA). Se subcultivaron en forma separada en medio sólido KC-E adicionándole agua de coco 10% v/v y fueron sembrados 4 PLB's por frasco de cultivo. A los 45 días se analizó el número

de pequeños protocormos y brotes generados por cada PLB's (tabla 3; figura 1 D), los cuales fueron fácilmente separables unos de otros. En el tratamiento con 10 μ M de BA aunque se observaron las primeras respuestas de brotación múltiple no se incluyen en la tabla 3, por presentarse un alto índice de contaminación.

Los PLB's provenientes del control, presentaron un 96% de respuesta, con un 100% de brotación múltiple (tabla 3) en un intervalo de 4 a 154 protocormos y brotes formados en cada PLB's, intervalo influenciado por el tamaño de algunos PLB's originados de los primeros PLB's formados, estos presentaban tallas de 1 o 2 mm, encontrándose estos en el inicio del desarrollo. Analizando los resultados de la tabla 3, se puede obtener en promedio la formación de 50 (1669/33) protocormos más brotes por respuesta de PLB's.

B. Cultivos contínuos de PLB's en medios líquidos. A los PLB's generados a partir del cultivo de protocormos en medios líquidos, fue necesario subcultivarlos cada 3 ó 4 meses, debido a que además de agotar los nutrimentos del medio, se incrementaba el material o PLB's (figura 1 C). Se subcultivó y dividió cada matraz a 4 matraces en medios nuevos, bajo el mismo tratamiento. Los PLB's mostraron un gran potencial al subdividirse en medio líquido, siendo insignificante (menos del 5%) el desarrollo a estadios más avanzados (brotes o plántulas) en los cultivos en suspensión.

Extrapolando se puede decir que cada PLB's genera cuando menos 4 PLB's iguales cada 3 meses, lo que indica que por cada protocormo subcultivado en medio líquido se tendrá un total de

64 PLB's a un año con tres meses de subcultivos, lo cual corresponde a 3200 explantes (protocormos más brotes) o si se desea incrementar la formación de PLB's en medio líquido este puede ser en forma exponencial durante el tiempo deseado (figura 1 C), y como se indica en los resultados reportados con otras especies utilizando este sistema (Morel, 1974; George and Sherrington, 1984).

Con respecto a la proliferación de PLB's en cultivos líquidos en agitación constante, no existe una explicación clara de este efecto. Es posible que la agitación impida el desarrollo de polaridad, con lo cual se inhibe el desarrollo de raíz y del brote. Además los medios líquidos en agitación mejoran la aereación, incrementan el área de superficie y permiten la dilución homogénea de metabolitos los cuales podrían ser tóxicos (Arditti, 1977; Hoppe and Hoppe, 1988).

Protocormos somáticos, ápices de tallos y otros explantes pueden ser proliferados en medios líquidos, desarrollándose a PLB's y al ser subcultivados en medio sólido desarrollan plántulas sin la aplicación de fitohormonas en ambos cultivos (Intuwong and Sagawa, 1974, 1975; George and Sherrington, 1984). También se sabe que altas concentraciones de citocininas y bajas en auxinas o en ausencia de éstas últimas, se estimula la proliferación de PLB's (Morel, 1974; Tanaka and Sakanashi, 1977; Kusomoto, 1978, 1979b) y la formación de brotación múltiple en protocormos seccionados, sin formar PLB's (Martínez, 1985). Aunque existen reportes que atribuyen este efecto a altas concentraciones de auxinas con respecto a las citocininas (Chong and Hua, 1978; Sagawa and Kunisaki, 1982; Kerbauy, 1984).

C. Formación de PLB's en el subcultivo de protocormos en medio KC con nopal en las diferentes especies germinadas. En frascos de desarrollo de plantas in vitro se observó en forma espontánea el potencial de algunos protocormos para desarrollarse a PLB's (figura 1 F) en las diferentes especies trabajadas, este sistema de propagación no se analizó en cuanto al porcentaje de incidencia y el poder establecer un sistema de propagación continua de estos explantes, el cual ya ha sido utilizado para Laelia anceps Lindl. var. alba (Luna, 1982). Rubluo et al. (1989) reportan esta potencialidad de generar PLB's en medio sólido, aunque en forma esporádica.

V.8 Efecto de los reguladores del crecimiento y el pH en el desarrollo de brotes de Bletia urbana Dressler.

Utilizando las mismas plantas, se hicieron las evaluaciones por separado. a) desarrollo del brote (tabla 4; figura 1 Z) y b) la formación y crecimiento de raíz (tabla 5; figura 1 Z), lo cual permitió analizar y encontrar un medio nutritivo propicio para el desarrollo de las plántulas in vitro de esta especie.

A. Efecto de la interacción de fitohormonas en el desarrollo in vitro de los brotes de B. urbana. El efecto de las fitohormonas en el crecimiento de los brotes de B. urbana (apéndice 5) en los 12 tratamientos, A-L (tabla 4; figura 1 Z) se analizaron bajo pruebas de significancia estadística. El análisis de varianza registró una F altamente significativa (tabla 4A). un análisis posterior de intervalo múltiple de Duncan y Tukey (tabla 4B) mostró que para ambas pruebas la diferencia notable era del tratamiento E (5 μ M de BA + 1 μ M de ANA) con respecto a los otros

11 tratamientos; sin embargo, el análisis de Tukey revela no significatividad entre el tratamiento E y C (tabla 4B); por otro lado, se sabe que en general, el análisis de prueba de Tukey es más estricto en su clasificación; donde 5% de este análisis es casi igual a 1% del análisis de Duncan (Reyes, 1980). Por lo tanto, para fines de rentabilidad en la utilización de fitohormonas usadas, sería recomendable el tratamiento C con 5µM de ANA, debido a que las auxinas son de las de más bajo precio en comparación a las citocininas. Es importante señalar que el coeficiente de variación es mayor del 15% (tabla 4) dentro de cada uno de los tratamientos donde existió respuesta, lo cual indica alta variabilidad (Reyes, 1980; Snedecor y Cochran 1978), debida probablemente a dos factores en relación al origen de los brotes: a) por provenir de varias semillas y b) estos brotes fueron obtenidos de la brotación múltiple a partir de secciones de protocormos, sujetos en un barrido hormonal de altas concentraciones de BA (1, 5 y 10 µM) y bajas en ANA (0.01, 0.1 y 1 µM) derivados del trabajo realizado por Martínez (1985). Probablemente los explantes estaban alterados fisiológicamente lo que pudo haber estimulado una respuesta heterogénea; además, no puede descartarse que hayan sufrido cambios genéticos in vitro.

En cuanto al efecto de las fitohormonas, Kusomoto (1978 y 1979b) informa que la interacción auxina:citocinina (2,4-D 0.1 mg/l y K 0.1-1 mg/l; ANA 0.01-1 mg/l y K 0.1-1 mg/l) estimulan el crecimiento de plántulas del género Cattleya. El ANA a 0.1 mg/l, estimula el crecimiento de plántulas de Bletilla sp., Cymbidium madidum Lindl. e híbridos de Lycaste aromatica (Graham ex Hooker) Lindl. X Chondrorhyncha discolor (Lindl.) P.H.Allen. El AIA

(1mg/l) mejora el desarrollo de plántulas y el número de hojas de Vanda roxburghii R.Br.; el ANA a esa misma concentración disminuye la respuesta (Bose and Mukherjee, 1974; Strauss and Reisinger, 1976).

B. Efecto de la interacción de las fitohormonas en la formación de raíz in vitro, en brotes de B. urbana Dressler. El efecto de las fitohormonas en la formación de raíz en los brotes de B. urbana (tabla 5; figura 1 Z) de los 12 tratamientos, se analizó estadísticamente de la misma forma que el crecimiento del brote discutido anteriormente. El análisis de varianza registró una F altamente significativa (tabla 5A). Esto permitió sujetar a los datos a un análisis de rango múltiple de Duncan y Tukey (tabla 5B); mostrando ambos al tratamiento A (medio basal: sin fitohormonas) como el mejor con respecto a los tratamientos B-L (tabla 5B). Sin embargo, existen reportes sobre el efecto benéfico de los reguladores del crecimiento en la formación de raíz en concentraciones de 0.01-0.6 ANA mg/l o 10 mg/l de K en obscuridad o 1 μ M de BA en plantas del género Cymbidium; 1 o 1.25 mg/l de ANA en Vanda; 1 mg/l de GA₃ o 0.1 mg/l ANA, promueven la formación y crecimiento de raíces (Arditti, 1977; Mukherjee, 1974; Kusomoto 1978; Rao, 1977). Como se puede observar, no existe un patrón definido para el desarrollo de raíces promovido por estas fitohormonas (auxinas, citocininas y giberelinas). Además el utilizar una concentración de la(s) fitohormona(s) por arriba del requerido, puede inducir in vitro otra respuesta morfológica no deseada. Para tener un conocimiento más amplio del efecto de una fitohormona con respecto a la formación de raíz en

brotos de B. urbana, es necesario realizar un barrido más amplio ya que los reportes bibliográficos muestran diferencias de respuestas entre una especie y otra, y en algunas ocasiones en la misma especie Arditti et al., 1981; Arditti and Ernst, 1984). En los resultados obtenidos, en el mejor de los casos, un 60% de los brotes (6 de 10 brotes) formaron raíces muy incipientes (11.5 mm de largo en promedio por respuesta), a diferencia del control, en donde se registro el 100% de respuesta de formación de raíz (32.4 mm de longitud por brote) (tabla 5). La respuesta de enraizamiento entre los tratamientos es similar al caso anterior, donde existe un coeficiente de variación muy alto entre los tratamientos (>15%; tabla 5).

C. Morfología de brotes de B. urbana, sujetos a diferentes fitohormonas para la formación de plantas completas (crecimiento del brote y formación de raíz). Un análisis morfológico de las plantas regeneradas a partir de explantes sometidos al efecto de las fitohormonas en el crecimiento de brotes y formación de raíz en B. urbana (tablas 4 y 5; figura 1 Z), en general se pudo observar que los brotes presentaban una elongación de las hojas y tallos, siendo éstos muy frágiles los cuales se doblaban al estar fuera del tubo de ensaye. Además, se observó que estas plantas carecían o era muy incipiente la formación de raíces, a diferencia de las plantas en el medio control, donde se observaban normales y robustas, con desarrollo significativo de raíces, esta observación visual indicó que el tratamiento A (control; tabla 4 y 5) fué el de mejor respuesta. Es necesario utilizar otras fitohormonas y ampliar el barrido en futuras investigaciones relacionadas con el tema, para poder establecer

la concentración más adecuada en el desarrollo de brotes de B. urbana, además de enriquecer con compuestos orgánicos (vitaminas, aminoácidos, etc.). Esto permitiría tal vez que la planta sujeta al efecto hormonal respondiera adecuadamente y no se de una activación del crecimiento en medios nutritivos que no proporcionen los requerimientos demandados. Para estos estudios, debido a que las condiciones fisicoquímicas in vitro están altamente controladas, se eliminan en cierta forma errores. Por otro lado, para tratar de obtener una respuesta homogénea (lo cual no es lo recomendable para una especie que está amenazada) se tendría que reducir la variabilidad genética que presentan los brotes utilizados (debido a que su origen es de varias semillas) y emplear para tal efecto clones (material biológico de un solo individuo), reduciéndose de esta manera la varianza entre los datos que se presentan dentro de los tratamientos. Sin embargo, para los fines planteados de recuperar poblaciones, es importante toda la variabilidad genética que pueda presentarse.

D. Respuesta del crecimiento y formación de raíz en brotes de Bletia urbana sembrados bajo condiciones in vitro, en medio KC-E a pH 5.0 y 5.3. A los incrementos en longitud registrados de los tratamientos A (pH 5.3) y M (pH 5.0), (apéndice 5; tablas 4 y 5; figura 1 Z) se les sujetó a un análisis de varianza y en ambos casos, crecimiento del brote y formación de raíz, no se observaron diferencias significativas debidas a este cambio de pH. En los datos presentados en las tablas 4 y 5 en los 4 casos se manifiesta una población muy variable dentro de los tratamientos (tabla 4 y 5: coeficiente de variación >15%),

similar a lo que sucede en los cultivos sujetos a diferentes fitohormonas, discutido ampliamente en el punto anterior (V.8 - C).

El incrementar el pH a 5.3 para el crecimiento de plántulas in vitro de orquídeas, citado por Arditti (1977), no mostró ser favorable. Por lo cual, no se alteró en las siguientes investigaciones, el pH 5.0 originalmente reportado para el medio KC (Knudson, 1946). Sin embargo para un mayor conocimiento del efecto de pH en el crecimiento de brotes y formación de raíz en B. urbana, sería recomendable ampliar los intervalos de pH (ej. 4.4, 4.7, 5.0, 5.3, 5.6 y 5.9) para establecer una mejor aseveración a este respecto, probablemente menores de pH 5, debido a que se ha comprobado que muchas de las orquídeas, al igual que algunas plantas ornamentales, musgos (Sphagnum) y algunas Gimnospermas prefieren un pH 5 o menor (Millar et al., 1975); además, B. urbana crece en un suelo rocoso de lava volcánica, basalto extrusivo (Pedregal de San Angel, D.F.), lo que le confiere un suelo ácido. Por otro lado, el desarrollo de esta investigación retrasaría el cumplimiento del objetivo principal de recuperar especies en peligro de extinción, al trabajar dichas especies casi siempre se cuenta con poco material biológico. Además de poco apoyo económico y humano para realizar estas investigaciones.

V.9 Efecto de compuestos orgánicos en el desarrollo de plántulas de L. skinneri var. skinneri en condiciones in vitro.

Debido a que en el medio básico KC las plantas respondieron inicialmente de una forma lenta en el crecimiento y que existen reportes donde medios más complejos favorecen el desarrollo de

las plántulas in vitro (Ernst, 1967; Arditti, 1977; Chee, 1981; Huang, 1984); se procedió a explorar extractos orgánicos que fueran accesibles de conseguir y que además su utilización permitiera establecer un rápido desarrollo y vigor de las plántulas (tabla 6; figura 1 EH). Para tal situación se planteó la utilización del medio KC para ser utilizado como testigo. Las plántulas de L. skinneri var. skinneri con tallas de 30 mm de longitud promedio se cultivaron durante 20 semanas, al término de las cuales, se registró un incremento en longitud de 30 mm en promedio, con pobre presencia de raíces y ausencia total de pseudobulbo (tabla 6). Comparando estos resultados con la utilización del medio KC-E adicionado con 30 mg/l de glutamina, se logró observar un incremento neto de 40 mm de longitud en promedio, es decir 10 mm sobre los resultados en el medio basal (control); un crecimiento significativo de raíz y la formación de pseudobulbo definido (tabla 6). La presencia de vitaminas en los cultivos in vitro promueve el crecimiento de tejidos y órganos (Arditti, 1967; Arditti and Ernst, 1984; Gamborg, 1982), además la glutamina, por ser uno de los aminoácidos que han sido encontrados en cantidades relativamente altas en muchas plantas y por su probable función como agente de transporte y de almacenaje de nitrógeno (Devlin, 1980), favorecieron el crecimiento de las plantas in vitro.

A. Extracto de plátano (Musa paradisiaca Lour.). El plátano presenta ácidos orgánicos, proteínas, aminoácidos, lípidos, pigmentos, compuestos nitrogenados, azúcares, etc., (Stover and Simmonds, 1987). La utilización del extracto de plátano en sus

dos estados, maduro e inmaduro (tabla 6), promovió resultados muy contrastantes. El inmaduro dió mejor respuesta en el crecimiento de la planta (incremento neto 70 mm), desarrollo de raíz (muy bueno (+++), 4 o más raíces y con una longitud total >10 cm) y en formación de pseudobulbo de 12 mm de longitud, a diferencia de la utilización de plátano maduro, con el cual se presentó una inhibición clara en el desarrollo de las plántulas, si se comparan con los resultados del medio control. Esta respuesta se debe probablemente a que las frutas en el proceso de maduración presentan alto contenido de etileno y precursores de éste, dicha hormona se reporta como un potente inhibidor del crecimiento de las yemas o zonas meristemáticas (Devlin, 1980). Además la concentración de azúcares en el plátano se incrementa con su maduración (Stover and Simmonds, 1987), se reporta que el azúcar a altas concentraciones en el medio de cultivo in vitro actúa inhibitoriamente en el desarrollo de las plántulas (Arditti, 1977).

B. El agua de coco, endospermo líquido (Cocos nucifera L.). Condujo a resultados satisfactorios tanto en el estado inmaduro, como en el maduro (tabla 6). En ambos hubo un incremento en el desarrollo del brote, en la formación de raíz y en la presencia de pseudobulbo, mostrando una mayor respuesta con el estado maduro. El agua de coco, así como otros extractos pueden proveer compuestos orgánicos que mejoran la tasa de crecimiento de las células in vitro (Gamborg and Wetter, 1975; Dodds and Roberts, 1982; Gamborg, 1982). Estos productos son poco usados y únicamente se recomiendan cuando fallan las mezclas químicas definidas para producir los resultados deseados (Gamborg, 1982).

En orquídeas debido a su dificultad en la respuesta morfogénica en medios básicos con hormonas y al lento crecimiento de las plántulas bajo condiciones in vitro, el agua de coco y otros complejos orgánicos han sido ampliamente utilizados (Ernst, 1967; Morel, 1974; Arditti, 1977; Chee, 1981; Huang, 1984). El agua de coco es rico en aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos nucleicos, vitaminas, sustancias del crecimiento, etc. (George and Sherrington, 1984), que estimulan muy eficientemente la morfogénesis y el crecimiento de las plantas de orquídeas.

C. Extracto de Nopal (Opuntia ficus-indica (L.) Miller). Los cladodios jóvenes de nopal resultaron ser el complejo orgánico que permitió los mejores resultados (tabla 6), igualando el desarrollo del brote y raíz con el extracto de plátano inmaduro y lograndose tallas de pseudobulbos hasta de 15 mm de longitud. Este hecho señaló al nopal como el mejor complemento aplicado al medio para el desarrollo in vitro de plántulas de L. skinneri var. skinneri. Aunque no había sido reportada su utilización en cultivos in vitro, se decidió su elección en un estadio de desarrollo o crecimiento activo, considerando que las zonas meristemáticas, que son abundantes, se presentan en la planta como regiones de mayor crecimiento (Devlin, 1980) y los cladodios presentan un meristemo apical o cono de crecimiento muy grande, formado por un conjunto de zonas meristemáticas (Bravo-Hollis, 1978). Análisis bioquímicos muestran la presencia de vitaminas, lípidos, proteínas, compuestos nitrogenados, aminoácidos, etc., además de bajas concentraciones de azúcares (Borrego y Burgos, 1986). Estos complejos orgánicos pueden ser ricos en compuestos

que la planta puede incorporar más rápidamente a su metabolismo. La presencia de reguladores del crecimiento naturales, pueden ser los requeridos por las plántulas, en concentración y combinación adecuada, debido a que el cultivo de tejidos, órganos y plántulas bajo condiciones in vitro dependen en cierta forma de una nutrición heterótrofa (Dodds and Roberts, 1982; George and Sherrington, 1984). Demostrada al utilizar sacarosa en los medios de cultivo como un sustituto de la fuente de carbono natural o de dióxido de carbono y el crecimiento celular (callo) en ausencia de luz. Aunque también, se ha comprobado la nutrición autótrofa (fotosíntesis) de células y tejidos cultivados bajo condiciones in vitro, en presencia de luz y dióxido de carbono (1-2% v/v) adicionado al medio en lugar de utilizar sacarosa u otra fuente de azúcar (Hüsemann, 1984).

Después de la germinación en medio KC-E, los protocormos y plántulas de las especies Lycaste aromatica y Oncidium stramineum se sujetaron igualmente a crecer en el medio con extracto de nopal, en el cual respondieron favorablemente, llegando hasta el desarrollo de plantas completas y robustas (>8 cm de longitud de las hojas), con más de 3 raíces (>10 cm de la longitud total) y presencia de pseudobulbo (para el caso de la primera especie) bajo cultivo in vitro, facilitando su aclimatación en condiciones de invernadero. Para los casos de oxidación in vitro de los explantes, se adicionó al medio de cultivo 1-2% de carbón activado. Este sistema de crecimiento de las plántulas en el medio nutritivo KC más extracto de nopal, también se aplicó a las otras especies que posteriormente fueron germinadas (tabla 2; figura 1 EH). En las dos especies antes mencionadas y el resto

de las que se reportan en la tabla 2, no se realizaron mediciones de crecimiento de las plántulas, debido a que el tiempo en medir se utilizó en otras actividades como la adaptación de plantas en condiciones de invernadero y liberación de 3 especies en el habitat natural, además de que las plántulas respondieron satisfactoriamente bajo el tratamiento in vitro.

V.10 Aclimatación de las plantas de condiciones in vitro a invernadero. En las plantas completas (raíz, pseudobulbo (para el género Lycaste) y hojas) que presentaban más de 8 cm de longitud (pseudobulbo y hoja más larga) en L. skinneri var. skinneri y L. aromatica, no existió ninguna pérdida bajo las condiciones de aclimatación a que se sujetaron en el invernadero (figura 1 H I). O. stramineum bajo estas condiciones registró ahogamiento de las raíces por lo tanto, pérdida total en la aclimatación (muerte de las plantas), respuesta debida probablemente a que se encuentra creciendo en la naturaleza con hábito epífita estricto, aunado esto a la posible presencia de alta humedad del sustrato (hoja de encino y agrolita 1:1) donde fue plantada y a la variación registrada en la temperatura (hasta de 40°C en 24 h). Este paso fué desfavorable, lo que llevó a buscar nuevas alternativas como el liberarlas directamente en el habitat (figura 1 HJ), utilizando ramas lisas.

Durante el último mes previo a su traslado y reintroducción las plantas de O. stramineum se mantuvieron en condiciones in vitro de alta intensidad de luz (16 h luz, 3000 lux) y agotamiento casi total del medio nutritivo, de tal forma que se presentaban baja humedad relativa dentro de los frascos y las

hojas con inicios de deshidratación. Esto se aplicó con la finalidad de que pudieran adquirir cierta resistencia a las condiciones prevalecientes en la naturaleza (fluctuaciones de temperatura entre 20 y 25°C en el verano, intensidades aproximadas de luz entre 5 a 12 mil lux y alta humedad relativa con la presencia de neblina).

V.11 Liberación y sobrevivencia de las plantas en el habitat natural. Después de su adaptación a condiciones de invernadero, las plantas de L. aromatica y L. skinneri var. skinneri fueron transportadas al habitat natural (figura 1 IJ). De L. skinneri var. skinneri fueron liberadas 2403 plantas en 6 lugares (que se les denominó estaciones) alrededor de la laguna de bosque azul, del Parque Nacional "Lagos de Montebello", en el Estado de Chiapas, la localidad se escogió debido a que era en las fechas de liberación la zona más protegida del parque y a que en esta franja que colinda con la laguna presenta encinos y es mas húmeda que la zona de pinos existente más retirada de la laguna, además de que ahí existen colonias silvestres de L. aromatica en algunas de las localidades escogidas. La sobrevivencia a los 6 meses de evaluación fue muy variada en las diferentes estaciones (tabla 7), sobreviviendo un total de 1677 plantas (69 %).

De L. aromatica se liberaron 1188 plantas en el mismo bosque y fecha, pero únicamente en 4 de las estaciones escogidas al azar (tabla 7) sobreviviendo 708 plantas después de 6 meses de reintroducidas, llegando a un promedio general de 60% de sobrevivencia.

En ambos taxa, L. skinneri var. skinneri y L. aromatica en

la estación 6 existió una disminución notable de las plantas (aproximadamente un 27%) en comparación con los resultados de las otras estaciones, donde el porcentaje de sobrevivencia fluctuó entre 68% y 96%. Lo anterior fue debido probablemente a que en la estación 6 las plantas estuvieron más expuestas a las corrientes de aire que ahí prevalecen, además que la plantación se hizo en troncos o eje principal de los encinos que presentaban poco sustrato orgánico acumulado.

Las plantas de *O. stramineum*, liberadas en el habitat natural (bosque de encino), Huatusco, Veracruz; se colocaron en ramas (por ser una especie epífita), sujetándolas con tiras de tela de algodón, debido a que este material no oprime demasiado (no estrangula) las raíces con los cambios de temperatura y humedad, además que se biodegrada en aproximadamente 6 meses, tiempo suficiente para que sus raíces se adhirieran al tallo de la planta (sustrato) y continuaran su desarrollo.

Las plantas de *O. stramineum* fueron reintroducidas en el habitat natural en 3 fechas, abril y julio de 1987 y julio de 1988 (tabla 8), en esta última se liberó más del 90% de las plantas. Las llevadas al campo en abril de 1987 fueron 38 y a poco más de un año de evaluación (julio de 1988) presentaron una drástica disminución a 7 plantas, muy probablemente debido a que las plantas no tuvieron una preadaptación en condiciones de invernadero, ya que salieron directamente del frasco al campo, además las lluvias no se habían establecido en la región. Esto pudo haber actuado como una limitante en la adaptación. En julio de 1989 se registró un promedio general de 40% de sobrevivencia

de las plantas liberadas en las 3 fechas (tabla 8). El sustrato utilizado (ramas y tallos centrales) fueron de 5 tipos para esta especie: 2 silvestres o nativas (Quercus sp. y Yucca sp.) y 3 introducidas en la región (Citrus sinensis (L.) Osbeck, Inga sp. y Mangifera indica Mill.). En los tallos de Inga sp. no existió sobrevivencia, mientras que en los otros 4 tipos de sustrato no se observaron problemas de adherencia y crecimiento, probablemente este rechazo esté relacionado con la ausencia de líquenes y otras epífitas en la corteza de estos, aunque fué notorio observar algunas epífitas (orquídeas y bromelias) en las bases de las primeras ramificaciones de estos árboles. En los sustratos en que sí se fijaron las raíces de las plantas al menos existían líquenes.

Por otro lado sí fue notoria una inhibición del crecimiento en cuanto a las plantas sujetas a mayor intensidad de luz (orientadas al sur), éstas a pesar de haber sobrevivido por 2 años, su crecimiento ha sido muy lento en comparación con las orientadas al norte y las que no recibían luz directa en forma prolongada, las cuales presentan tallas superiores al 100% de crecimiento con respecto a las sujetas a 3-5 h de luz directa. A ninguna de las 3 especies liberadas se les regó en el momento de la plantación o posterior a ésta. En la mayoría de los casos, existía humedad en el ambiente y sustrato en el momento de la liberación.

El mapa sobre la distribución de las localidades exactas de liberación de las 3 especies, no se presenta con el fin de proteger en cierta forma las plantas liberadas.

Es posible que la mejor época de liberación de las plantas

pueda ser en el verano y cuando las lluvias se han establecido, debido a que los habitats presentan las condiciones más adecuadas en humedad y temperatura, aunque probablemente sean más susceptibles a la abundante presencia de sus depredadores en las estaciones de lluvias (verano y otoño). En el Estado de Veracruz se observó sequía muy larga, con lluvias muy tenues en la primavera (abril y mayo) en ambos años posteriores a la liberación de las plantas (1988 y 1989). A 1 año de liberadas algunas plantas de *O. stramineum* se encontraron muertas por deshidratación, sin mostrar daños mecánicos por herbivorismo, éstas eran plantas con más de 10 cm de largo, con crecimiento de raíz y adherencia al sustrato (rama). Otras plantas en el mismo sitio, se perdieron posiblemente por herbivorismo de larvas de lepidóteros, las cuales fueron observadas en gran cantidad adheridas en ramas y ejes centrales de los árboles, algunas plantas únicamente presentaron pequeñas heridas. Se sabe, por análisis químicos que las orquídeas presentan metabolitos secundarios, los cuales pueden resultar de sabor desagradable a sus depredadores, funcionando como medio de sobrevivencia (Erlich and Raven, 1967; Lüning, 1974; Pierson, 1969; Hausen, 1984). La heterogeneidad de respuesta puede ser debida a que el origen de las plantas fue a partir de la germinación de semillas. Al parecer prueba que actuó la selección natural en el campo en cada momento de su adaptación y desarrollo, son las observaciones de algunas plantas fueron devoradas en su totalidad, a diferencia de otras que únicamente presentaron pequeñas heridas, sin que esto afectara críticamente su sobrevivencia y crecimiento. Además

tampoco fueron depredadas el año siguiente aún cuando estuvieran presentes nuevamente las larvas de lepidópteros. Igualmente, plantas liberadas que han permanecido por más de un año, sus hojas presentaban una coloración café-rojizo, la coloración es también común observarla en las plantas silvestres del género Oncidium que crecen en esta región. Este efecto puede ser respuesta al "stress" a la época de secas (diciembre-mayo) en que pueden presentarse algunos días o incluso 1 o 2 semanas sin lluvias relevantes, además de manifestarse las temperaturas más bajas de todo el año (temperatura mínima registrada 12°C) y máxima (26-28°C) en el mes de mayo. Las hojas nuevas de estas plantas liberadas, que se formaban en el verano, surgían de color verde.

Por lo anterior es fácil notar que existe mucho por hacer, además de desarrollar un censo de la población silvestre que se desea trabajar. Siendo la variabilidad génica de la población para tomarse en cuenta en la propagación in vitro y liberación de poblaciones representativas, lo cual aseguraría su recuperación. Es importante también, establecer mejores condiciones hortícolas pre-reintroducción de las plantas, una preadaptación paulatina y así poder protegerlas de la deshidratación y plagas que puedan atacar a las plantas durante los primeros meses de adaptación en el habitat natural (probablemente 1 año), y eliminar cualquier carácter anormal que haya desarrollado durante su cultivo in vitro e invernadero, ejemplo fisiológico (falta de capas cerosas, apertura y cierre adecuado de estomas, etc.), bioquímicos (desconocimiento del sustrato, el tipo de suelo, pH, dureza, la microflora, establecimiento eficiente de los mecanismos

bioquímicos (metabolitos secundarios) que pueden actuar en defensa de radiaciones solares, de sus depredadores naturales como los herbívoros (larvas de lepidópteros) o el establecimiento adecuado de la simbiosis de micorrizas, sin que desemboque en su inicio en un parasitismo. Lo anterior es fundamental para establecer el equilibrio ecológico. Esto garantizaría una mayor sobrevivencia y un restablecimiento de la población (crecimiento, fructificación y progenie fértil por varias generaciones). Estas experiencias servirán de modelo para futuras recuperaciones de especies en peligro de extinción.

Observaciones recientes en campo (2 de noviembre de 1990), de las plantas liberadas de *Q. stramineum* en Huatusco Veracruz, muestran una sobrevivencia general del 10% de la población total, las cuales han continuado su crecimiento con la formación de nuevos brotes, hojas y raíces. Las plantas liberadas en abril de 1987, han permanecido creciendo en el hábitat natural por un tiempo de 3 años y 6 meses.

Se realizó un censo el 2 de enero de 1991 en las plantas liberadas en el Parque Nacional "Lagos de Montebello" Chiapas, el cual mostró, para *L. skinneri* var. *skinneri* una sobrevivencia general del 12% y 7% en *L. aromatica*. Ambas especies han permanecido por espacio de 2 años y 6 meses.

Uno de los problemas que ocasionó la mayor pérdida en los microhábitats en posición horizontal, fue la caída de hojas de los árboles del bosque, sepultando a la mayoría de las plantas.

En el Jardín Botánico del Desierto de Arizona, Estados Unidos de Norte América grupos interdisciplinarios han iniciado

la reintroducción de plantas de Mammillaria thornberi Orcutt, cactácea en peligro de extinción de zona árida; propagada por métodos tradicionales (germinación de semillas) (Ecker, 1989). Este grupo de investigadores establecen prioridades para este tipo de investigaciones, como el trabajar interdisciplinariamente entre horticultores, ecólogos y botánicos en la multiplicación, desarrollo y reintroducción de las plantas amenazadas, para garantizar la sobrevivencia a largo plazo de las poblaciones liberadas, argumentando que es importante tomar en cuenta la ecología de la planta en cuestión y las prácticas hortícolas.

V. 12 Consideraciones finales.

A. Consideraciones finales de los medios nutritivos establecidos para la propagación masiva in vitro de las 12 especies trabajadas y discutidas en forma independiente. Se estableció la germinación asimbiótica de 12 especies de orquídeas tropicales mexicanas (tabla 2), generalizando la aplicación del medio nutritivo KC-E y metodología desarrollada en esta investigación. La cual resultó ser adecuado para alcanzar porcentajes de germinación hasta del 100%, cabe aclarar que para cumplirse eficientemente esta afirmación es de suma importancia tener en cuenta el estadio en que se encuentren los embriones o semillas, debido a que este factor resultó ser una limitante en la germinación de semillas de algunos frutos, el porcentaje de germinación puede estar en relación directa con la inmadurez o con el tiempo de almacenamiento de las semillas a temperaturas de 8°C.

El desarrollo de plántulas in vitro se presentó con máximo crecimiento cuando el medio KC se enriqueció con 15% de extracto

de nopal aplicado inicialmente para Lycaste skinneri var. skinneri, estas condiciones de cultivo (medio nutritivo y condiciones de incubación) se repitieron para L. aromatica y Oncidium stramineum, alcanzando las plántulas en las tres especies, tallas de más de 8 cm de longitud, también se utilizó en otras especies como Bletia urbana, Laelia anceps, Lemboglossum ehrenbergii y Lycaste skinneri var. alba registrando la efectividad del medio nutritivo hasta estadíos más juveniles (3-7 cm de longitud), esto debido a la terminación del registro de datos de esta investigación. Para el caso en que se requería mantener los frascos saturados de plantas sin ser subcultivadas debido a que no se contaba con apoyo humano para hacer este tipo de trabajo, al medio nutritivo antes mencionado se le adicionó carbón activado (1-2 g/l) con la finalidad de retener o atrapar las sustancias que pueden llegar a ser tóxicas (liberación de alcaloides, antocianinas, cumarinas, flavonoides, glucósidos, compuestos fenólicos, terpenos, etc. (Hausen, 1984; Sakuta and Komamine, 1987)) con la acumulación constante, su presencia es notoria cuando los cultivo entran a la fase estacionaria o de lento crecimiento, presentandose más rápidamente cuando los frascos de cultivo son saturados de material biológico (células o tejidos o plántulas).

V.13 Recomendaciones del Conocimiento Adquirido a través de la experiencia.

A. Material biológico. Lo más recomendable es sembrar las semillas inmediatamente después de su colecta, sobre todo cuando se desconoce la duración del estado de latencia de las semillas y los factores para mantener por un período de tiempo más largo.

Para el caso de que se utilicen frutos verdes es necesario que estén en un estado cercano a la dehiscencia, si las semillas están muy hidratadas recomendable sembrarlas todas, ya que se ha reportado (Arditti, 1967) que bajo estas condiciones pierden la viabilidad rápidamente al ser conservadas a temperaturas de 4-8°C.

B. Desarrollo de plantas in vitro. Este puede acelerarse si se hacen cultivos continuos, que para orquídeas pueden realizarse cada 1 o 2 meses, además de sembrar aproximadamente 20-40 plántulas por frasco (con 100 ml de medio nutritivo), el número variará con la talla de la planta, lo que implica que a mayor talla menor número de plantas, de lo contrario agotan el medio de cultivo, lo que provocaría una competencia por luz, espacio y alimento.

Con subcultivos continuos se puede garantizar la obtención de plantas en condiciones in vitro, desarrollandolas a tallas de 8 o más cm de longitud, en un tiempo menor de 8 meses. Para todas las especies investigadas, existió una relación directa en la rápida respuesta de la germinación y desarrollo acelerado de las plantas, siendo los casos más notables los de B. urbana Dressler

y Q. stramineum (Lindl.) Batem. (6 y 10 días para germinación respectivamente; tabla 2), las cuales mostraron una mejor respuesta en el desarrollo de las plantas en comparación de L. skinneri var. skinneri y L. aromatica.

C. Conservación de germoplasma. Es posible almacenar material biológico en estadio de protocormos en medio de cultivo KC-E más la adición de 1-2 g/l de carbón activado, esto se pudo comprobar cuando los frascos germinadores estaban saturados de estos explantes, ocurriendo posiblemente un agotamiento de los nutrimentos que tal vez provocó un crecimiento mínimo, el carbón activado pudo haber actuado fijando las sustancias que liberan los explantes en condiciones in vitro, que por acumulación o a concentraciones elevadas pueden llegar a ser tóxicas o inhibitorias del crecimiento. El crecimiento limitado se presentó en las especies aquí reportadas, frascos germinadores en estadios de protocormos (1-2 mm) y de plántulas (0.5-2 cm), que se mantuvieron en el medio inicialmente sembrados, sin realizar subcultivos por 3 años, no mostraron crecimiento ni daño aparente, en las condiciones de luz (16 h luz, 1500 lux) y temperatura ($28' \pm 3^{\circ}\text{C}$) empleadas. Cuando algunos protocormos fueron subcultivados a medios frescos, estos continuaron su desarrollo a plántulas. Lograndose plantas de 10 o más cm de longitud cuando fueron subcultivados continuamente. De tal forma que del mismo fruto inicialmente sembrado, llegó a tenerse estadios de protocormo y plantas de tallas adecuadas para su adaptación en invernadero. Cuando en el transcurso del tiempo de cultivo se presentó una coloración amarillenta en los explantes, esta fue señal inequívoca de la necesidad de realizar

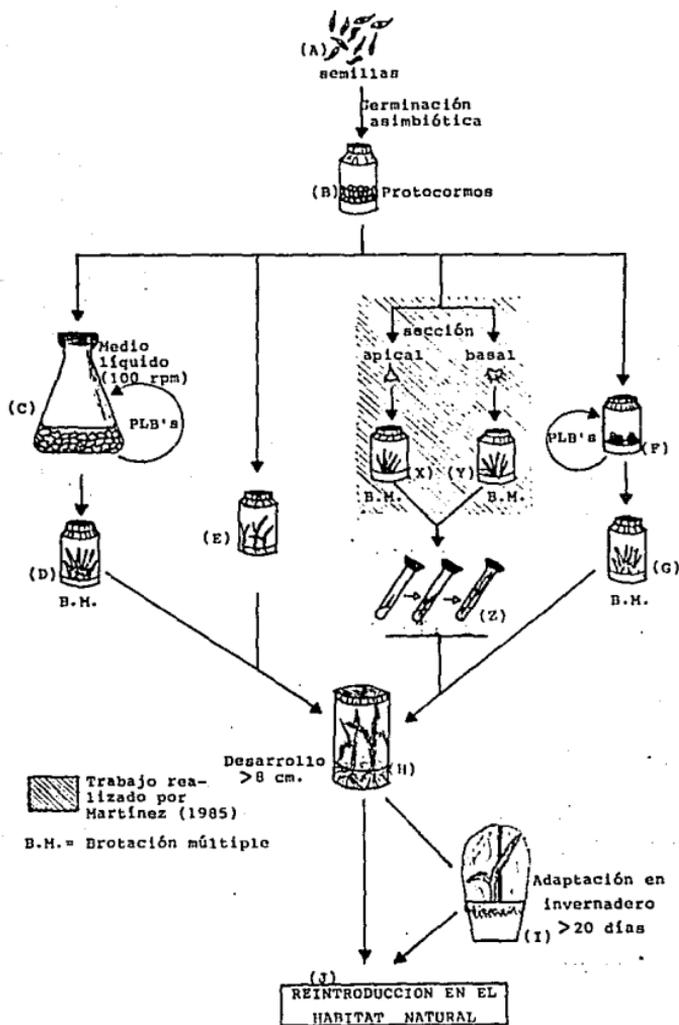
subcultivos para evitar su posible necrosis. Cuando no fue posible realizar el cambio a medio fresco ocurrió la muerte de algunas plántulas. Estos resultados muestran la necesidad de investigar sobre medios nutritivos más propicios para la conservación del germoplasma de orquídeas amenazadas de extinción, además de reducir la temperatura y encontrar las condiciones adecuadas de luz.

D. Desarrollo de plantas en invernadero. El sustrato a utilizar para la adaptación de las plantas a invernadero depende mucho del hábito que presentan en condiciones naturales (epífita o terrestre). Las epífitas estrictas, siempre crecen adheridas a ramas, expuestas al aire y rara vez se ocultan en el sustrato; para este caso no se recomienda sembrar las plantas en charolas con suelo. Se recuerda el caso de *O. stramineum* en que no se observó crecimiento de las raíces bajo el sustrato, y sí la muerte de la mayoría de ellas días después del trasplante al invernadero. Esto contrastó con la respuesta de esta especie al ser liberada en el hábitat natural, donde en ramas lisas de diferentes árboles, existió buen crecimiento y adherencia de las raíces desarrolladas *in vitro*. Por lo anterior se sugiere que en condiciones de invernadero la base de las plantas y raíces se sujeten a porciones de ramas de árboles que en forma natural albergan epífitas, lo que evitaría utilizar tallos de plantas alelopáticas o con presencia de sustancias tóxicas que no permiten el establecimiento de organismos de hábito epífita (líquenes, musgos, orquídeas, bromelias, etc.). Las especies de hábitos epífita-terrestre y las terrestres no presentan ningún

problema al ser plantadas en una mezcla 1:1 de hoja de encino triturada y agrolita, como lo demostraron las dos especies aclimatadas, Lycaste aromatica (Graham ex Hooker) Lindl. y Lycaste skinneri (Batem. ex Lindl.) Lindl. var. skinneri, donde el hábito epífita-terrestre es una característica de este género (Ames and Correl, 1953), con raíces que pueden crecer ocultas en el sustrato. Un factor importante en el establecimiento de las plantas en condiciones de invernadero es no saturar de agua al suelo al ser regadas periódicamente, debido a que se corre el riesgo de ahogamiento o pudrición de las raíces. Es también significativo que en la aclimatación y desarrollo de las plantas en invernadero no existan muy bajas o altas intensidades luminosas y temperaturas extremas, de lo contrario se corre el riesgo de inhibir el crecimiento. Otro factor que hay que tomar en cuenta es el investigar cuales son las condiciones del(os) microhabitat(s), donde crecen en forma natural, lo cual sería de mucha utilidad para simularlos en las diferentes etapas de su cultivo.

Respecto a la liberación de las plantas ya se discutió sobre como incrementar la sobrevivencia en la reintroducción en el habitat natural. Es importante hacer notar que las que fueron plantadas en sustratos horizontales (ej. troncos caídos), deberían revisarse periódicamente, para evitar que no sean cubiertas por la acumulación de hojas que desprenden los árboles, tomando más cuidado en la estación de otoño. Lo anterior ocasionó pérdidas en las plantas colocadas bajo estas circunstancias.

FIGURA 1. DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LA PROPAGACION MASIVA IN VITRO DE ORQUIDEAS AMENAZADAS DE EXTINCION.



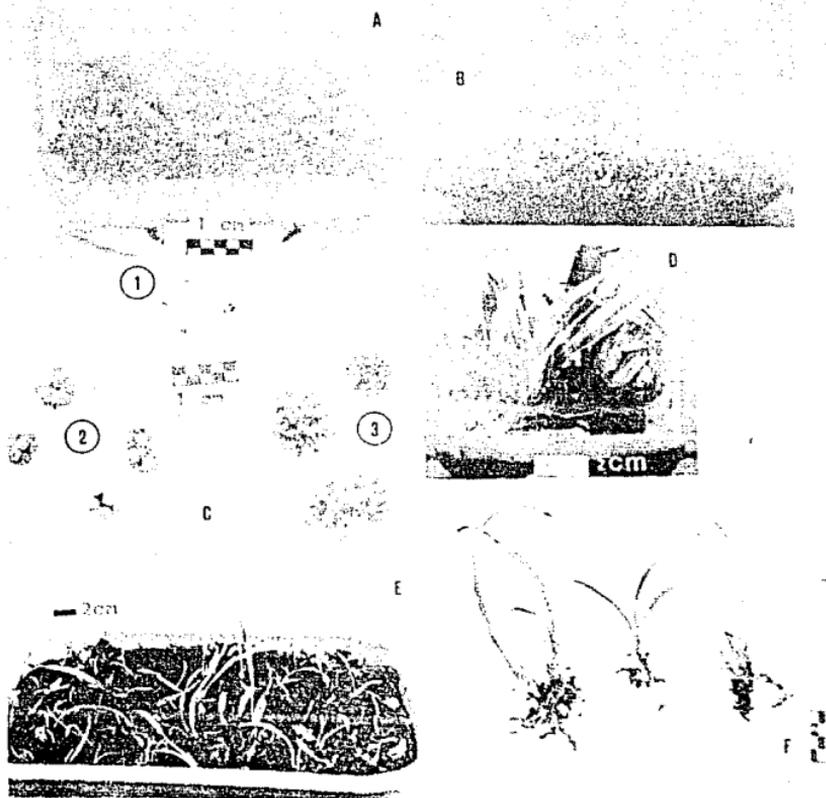


Figura 2. Cultivo in vitro y establecimiento en condiciones de invernadero de orquídeas mexicanas amenazadas de extinción. (A,B) Germinación asimbiótica (>90%) de semillas de - O. stramineum y L. skinneri var. skinneri. (C) Propagación masiva de O. stramineum a partir de protocormos (1) cultivados en medio líquido (2, después de 3 meses), originando brotación múltiple (3). (D) Desarrollo de plántulas in vitro -- (>8 cm longitud). (E,F) Establecimiento y crecimiento en condiciones de invernadero de las 2 sp. del género Lycaste.

TABLA 1. EFECTO DE DIFERENTES MEDIOS SOBRE LA GERMINACION MASIVA IN VITRO DE SEMILLAS INMADURAS DE L. SKINNERI VAR. SKINNERI, A $28^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

MEDIO NUTRITIVO	GERMINACION (%)	GERMINACION T (dias)	CONDICIONES DE LUZ
RNUDSON "C" (KC)	50	45	A, B
VACIN & WENT (VW)	50	45	A
MURASHIGE & SKOOG (MS)	<10*	50	A
MS/2	60	45	A
KC + 1 μM NAA	15	45	A, B
KC + 5 μM BA	20	45	A
KC + 5 μM GA ₃	15	45	A
MS/2 + 5 μM GA ₃	25	45	A
VW + 5 μM GA ₃	30	45	A
KC-E (2% SACAROSA)	>90	45	A, B, D
KC-E (3% SACAROSA)	90	45	A, B, C

A: 16 h luz (500 lux), 8 h obscuridad; B: 24 h obscuridad; C: luz continua (1000 lux); D: luz indirecta natural (1000 LUX); (*): necrosis (100%) de los protocormos (120 dias).

TABLE 2. GERMINACION IN VITRO EN MEDIO KC-5, LDI (500 UOI) E N. OSCURIDAD, 28° ± 3°C, DE SEMILLAS DE ACQUISTAS MEXICANAS ANEXIADAS DE EXTINCION.

ESPECIE	FRUTO No.	TIPO DE POLINIZACION	SEMILLAS Est. Fiol.	GERMINACION	GERMINACION
				%	† (dias)
<u>Bletia arborea</u> Dressler	1	AP	A	100	66
	2	AP	A	00	90
<u>Encyclia alata</u> (Bates.) Schltr.	1	PC	B	10	90
	2	PC	A	15	90
<u>E. citrina</u> (Llave & Lex.) Dressler	1	PN	A	40	37
<u>Iselia anceps</u> Lindl.	1	PN	B	90	30
	2	PN	A	50	35
<u>Leoboloxys cordata</u> (Lindl.) Halbigier	1	PC	B	75	45
<u>L. ehrenbergii</u> (Lindl. f. & Otto) Halbigier	1	PN	B	70	30
	2	PN	B	90	30
<u>Lycaste aromatica</u> (Graham ex Hooker) Lindl.	1	PN	B	80	56
<u>L. skinneri</u> (Bates. ex Lindl.) Lindl. var. <u>alba</u> Doubrain	1	AP	B	50	45
	2	PN	B	90	45
<u>L. skinneri</u> (Bates. ex Lindl.) Lindl. var. <u>skinneri</u>	1	PC	B	50	45
	2	PN	B	100	45
	3	PC	A	40	90
	4	PC	B	00	365
<u>Oncidium maculatum</u> Lindl.	1	PN	B	100	30
<u>O. stramineum</u> (Lindl.) Bates.	1	PN	B	100	10
<u>Phrynoschloa cinca</u> (Lindl.) Schltr.	1	PN	B	90	26
	2	PN	A	90	30
<u>Schralia sacrantha</u> Lindl.	1	AP	B	10	54

A= semillas liberadas de los frutos y almacenadas; B= semillas de frutos aún no dehiscientes; AP= Auto polinización; PC= Polinización cruzada de flores de la misma inflorescencia; PN= Polinización natural, debida probablemente a insectos en el habitat de la orquídea.

**TABLA 3. BROTAION MULTIPLE EN PLB's DE O. stramineum (LINDL.) BATEM., DESARRO-
 LLADOS A PARTIR DE PROTOCORMOS CULTIVADOS EN MEDIO KC-E EN SUSPENSION,
 A 16 H LUX (500 LUX), 8 H OBSCURIDAD, 28° ± 3°C.**

FRASCO No.	RESPUESTA (%)	No. PROTOCORMOS (INTERVALO) #a	No. BROTES (INTERVALO) #a	PROTOCORMOS + BROTES/FRASCO
1	4	28 (00-14)	152 (04-57)	180
2	4	82 (10-37)	211 (28-117)	293
3	4	45 (08-15)	76 (10-38)	121
4	3	53 (09-33)	151 (42-62)	204
5	4	26 (00-13)	36 (05-19)	62
6	4	87 (02-21)	188 (39-61)	255
7	3	31 (08-14)	131 (25-59)	162
8	3	46 (10-21)	94 (24-38)	140
9	4	50 (08-19)	202 (07-75)	252
9	33	428 (00-37)	1245 (04-117)	1689

(#) = se sembraron 4 PLB's/frasco (36/9 frascos: 96% de respuesta); (#a) = res-
 puesta por frasco; KC-E = ver apéndice 4.

TABLA 4. EFECTO DE LAS FITOHORMONAS (GA₃, BA Y ABA) Y EL pH* SOBRE EL CRECIMIENTO EN BROTES (20 mm) DE *Rietia urbana* DRESSLER, DESPUES DE 7 SEMANAS DE CULTIVO, A 28° ± 3°C, 16 H LUZ, 1000 LUX.

REPETICION n ₁	TRATAMIENTOS (incremento neto mm).												
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1	35	35	20	20	20	00	00	45	10	00	20	00	50
2	00	19	20	**	70	20	00	05	35	25	00	15	30
3	25	35	50	**	70	25	30	05	17	15	50	00	15
4	23	00	25	00	**	07	**	30	00	15	00	00	00
5	10	30	35	00	00	07	20	00	00	00	60	50	30
6	00	00	35	20	55	05	00	14	**	10	15	25	40
7	00	20	32	13	70	20	10	35	40	00	10	00	15
8	30	25	10	00	20	00	**	**	**	13	00	35	30
9	45	00	35	20	30	00	30	**	15	08	00	**	15
10	**	16	00	15	40	40	**	**	**	17	**	00	35
11	20	**	26	**	**	13	15	19	**	**	21	20	23
12	22	**	25	**	52	**	12	**	**	10	**	**	30
\bar{X}	19	17	26	11	49	12	13	19	17	10	16	18	25
S	15	14	13	09	28	13	12	16	14	08	21	18	14
CV	79	82	50	82	57	108	92	84	82	80	131	100	56
SE	4.5	4.4	3.7	3.2	8.8	3.9	4	5.6	4.9	2.5	6.3	5.7	4.2

(*)= ver apéndice 5 para concentración de fitohormonas y pH;
 (**)= muerte del brote; (*a)= cada repetición implicó un brote por tubo de ensaye.

TABLA 4A. ANALISIS DE VARIANZA DEL INCREMENTO IN VITRO DE BROTES DE B. urbana, SUJETOS A DIFERENTES FITORREGULADORES DEL CRECIMIENTO (GA₃, BA, ANA).

FUENTE DE VARIACION	SC	GL	CM	F	F SIGNIFIC.
TRATAMIENTO	11796.3	11	1072.4	4.081**a	0.000
ERROR	27854.3	106	262.8		
TOTALES	39650.6	117			

a: Altamente significativo <0.001

TABLA 4B. ANALISIS DE INTERVALO MULTIPLE DE DUNCAN Y TUKEY EN EL EFECTO DE LAS FITOHORMONAS SOBRE EL CRECIMIENTO DE BROTES DE Bletia urbana DRESSLER.

TRATAMIENTO	DUNCAN*	\bar{X}	TUKEY*
J	a	9.6000	x
D	ab	11.0000	x
F	ab	12.4545	x
G	ab	13.0000	x
K	ab	16.0000	x
I	ab	16.7500	x
B	ab	17.1000	x
L	ab	18.0000	x
A	ab	19.0909	x
H	ab	19.1250	x
C	b	26.0833	xy
E	c	48.7000	y

* = 0.05 nivel de confianza.

TABLA 4C. ANALISIS DE VARIANZA DEL CRECIMIENTO DE BROTES DE B. urbana,
SUJETOS A pH 5.0 y 5.3.

FUENTE DE VARIACION	SC	GL	CM	F	F SIGNIFIC.
TRATAMIENTO	210.182	1	210.182	1.011a	0.327
ERROR	4157.091	20	207.85		
TOTAL	4367.273	21			

a= No existe diferencia significativa

TABLA 5. EFECTO DE LAS FITOHORMONAS (GA₃, BA Y ANA) Y EL pH* SOBRE LA FORMACION DE RAIZ EN BROTES (20 cm) DE *Bietia urbana* DRESSLER, DESPUES DE 7 SEMANAS DE CULTIVO, A 28' ± 3°C, 16 H LUZ, 1000 LUX.

REPETICION *A	TRATAMIENTOS (longitud cm).												
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1	45	00	00	00	00	00	00	10	06	00	07	00	95
2	05	00	00	**	10	00	00	00	00	00	30	00	89
3	12	00	00	**	23	00	19	00	00	00	13	00	00
4	50	00	00	04	**	00	**	00	00	00	00	00	00
5	55	00	00	00	00	00	00	00	00	12	00	03	20
6	33	09	00	00	15	00	00	00	**	00	00	00	123
7	50	06	00	02	00	00	00	00	00	00	00	00	00
8	18	00	00	00	05	00	**	**	**	04	00	05	35
9	30	00	00	00	06	00	00	**	00	00	00	**	25
10	**	02	00	00	00	00	**	**	00	**	00	00	**
11	31	**	00	**	**	00	03	01	**	**	04	00	50
12	28	**	00	**	10	**	00	**	**	00	**	**	70
\bar{X}	= 32	1.7	00	0.7	6.9	00	2.4	1.4	0.7	1.6	2.2	0.8	51
S	= 16	3.2	00	1.5	7.7	00	6.3	3.5	2.1	3.9	4.3	1.7	43
CV	= 140	30	00	20	77	00	70	39	21	39	39	17	391
EE	= 4.8	1.0	00	0.5	2.4	00	2.1	1.2	0.7	1.2	1.3	0.5	13

(*): ver apéndice 5 para concentraciones de fitohormonas y pH; (**): muerte del brote; (*A): cada repetición implicó un brote por tubo de ensaye.

TABLA 5A. ANALISIS DE VARIANZA DE LA LONGITUD TOTAL DE RAIZ IN VITRO, EN BROTES DE B. urbana, SUJETAS A DIFERENTES FITOREGULADORES DEL CRECIMIENTO (GA₃, BA, ANA).

FUENTE DE VARIACION	SC	GL	CM	F	F SIGNIFIC.
TRATAMIENTO	9818.8	11	892.6	22.996**a	0.000
ERROR	4114.5	106	38.82		
TOTALES	13933.3	117			

a: Altamente significativo <0.001

TABLA 5B. ANALISIS DE INTERVALO MULTIPLE DE DUNCAN Y TUKEY EN EL EFECTO DE LAS FITOHORMONAS, SOBRE LA FORMACION DE RAIZ EN BROTES DE Bletia urbana DRESSLER.

TRATAMIENTO	DUNCAN*	\bar{X}	TUKEY*
C	a	0.0000	x
F	a	0.0000	x
D	ab	0.7500	x
I	ab	0.7500	x
L	ab	0.8000	x
H	ab	1.3750	x
J	ab	1.6000	x
B	ab	1.7000	x
K	ab	2.1818	x
G	ab	2.4444	x
E	b	6.9000	x
A	c	32.4545	y

* = 0.05 nivel de confianza.

TABLA 5C. ANALISIS DE VARIANZA DE LA LONGITUD DE RAIZ EN BROTES DE B. urbana, SUJETOS A pH 5.0 Y 5.3.

FUENTE DE VARIACION	SC	GL	CM	F	F SIGNIFIC.
TRATAMIENTO	2004.55	1	2004.54	1.892a	0.1840
ERROR	21189.45	20	1059.47		
TOTAL	23194.00	21			

a= No existe diferencia significativa.

TABLA 6. DESARROLLO IN VITRO DE PLANTAS, 30 MM, DE *Lycaste skinneri* (BATEM. EX LINDL.) LINDL. VAR. *skinneri*, DESPUES DE 20 SEMANAS DE CULTIVO, A 16 H. LUZ, 1500 LUX, 28' ± 3°C.

MEDIO NUTRITIVO	PLANTA (incremento neto mm)	RAIZ	PSEUDOBULBOS (longitud mm)
1) Enudson "C" (EC) + micronutrientes (EC-E)	30	+	-
2) EC-E + Glutamato (30 mg/l)	40	++	06
3) EC + Plátano inmaduro (10% P/V) + micronutrientes (EC-E)	70	+++	12
4) EC + Plátano maduro (10% P/V) + micronutrientes (EC-E)	10	+	-
5) EC + Agua de coco inmaduro (20% V/V) + micronutrientes (EC-E)	40	++	08
6) EC + Agua de coco maduro (20% V/V) + micronutrientes (EC-E)	50	++	10
7) EC + extracto de nopal, tallos jóvenes (15% P/V) + micronutrientes (EC-E)	70	+++	15

(-): ausencia; (+): pobre; (++)= buena; (+++)= muy buena.

TABLA 7. EVALUACION DE SOBREVIVENCIA DE *L. skinneri* VAR. *skinneri* y *L. aromatica*, A 6 MESES (Jul. a Dic. 1988) DE REINTRODUCIDAS EN EL PARQUE NACIONAL "LAGOS DE MONTEBELLO" CHIAPAS.

ESTACION No	<i>Lycaste skinneri</i> var. <i>skinneri</i>		<i>Lycaste aromatica</i>	
	REINTRODUCIDAS	SOBREVIVIENTES	REINTRODUCIDAS	SOBREVIVIENTES
1	531	439	144	139
2	429	343	-	-
3	72	69	280	266
4	177	325	-	-
5	657	454	154	135
6	177	47	610	168
Total	2,403	1,677	1,188	708

TABLA 6. EVALUACION DE SOBREVIVENCIA DE PLANTAS DE *Q. straminea* (LINDL.) BATEM. REINTRODUCIDAS EN EL HABITAT NATURAL, BOSQUE DE ENCINO, BUATUSCO VERACRUZ.

PLANTAS No	FECHA REINTRODUCCION	S O B R E V I V E N C I A				ADAPTACION ANOS
		(Jul. 88)	%	(Jul. 89)	%	
38	Abril-1987	07	18*	03	43	2
85	Julio-1987	59	69*	31	53	2
578	Julio-1988			243	42*	1

*= a un año de reintroducidas.

VI. CONCLUSIONES

- El sistema de almacenamiento de las semillas (baja humedad utilizando para tal efecto cloruro de calcio anhidro y temperaturas de 4-8°C) resultó ser favorable para el almacenamiento a corto-mediano plazo (de días hasta 6 años) de las especies trabajadas.

- Con la transportación de los frutos del campo al laboratorio que permanecieron separados de la planta madre por 6 días, es probable que no afecte en la germinación de las semillas, debido a que algunos frutos bajo estas circunstancias registraron 90-100% de germinación asimbiótica (ej. O. stramineum, R. glauca y L. anceps).

- El sistema de desinfección desarrollado para frutos aún no dehiscentes no interfirió notoriamente en la germinación asimbiótica y sí mostró que las semillas dentro del fruto se encuentran libres de hongos y bacterias.

- La desinfección de las semillas almacenadas fué efectiva en cuanto a que no existió contaminación, utilizando la metodología reportada en la bibliografía. Aunque probablemente pudo ser el factor para que no todas las semillas germinaran o que no germinara ninguna de algunos de los frutos.

- Es necesario profundizar en la investigación sobre el estado fisiológico del embrión (su maduración dentro del fruto y el tiempo de almacenamiento) para poder obtener altos porcentajes de germinación asimbiótica (>50%) en cada una de las especies trabajadas.

- Se estableció el medio nutritivo KC-E, constituido por el medio KC más la adición de vitaminas y micronutrientes, dando una mejor respuesta que los medios basales utilizados (MS, VW y KC) este medio nutritivo fue utilizado posteriormente en la germinación asimbiótica de 12 especies de orquídeas silvestres, obteniendo en el mejor de los casos hasta 100% de respuesta.

- Fue observable una rápida respuesta en el tiempo de germinación al sembrar semillas de frutos aún no dehiscentes, en comparación con las obtenidas de semillas almacenadas.

- El efecto de las fitohormonas a las concentraciones utilizadas, resultaron inhibitorias tanto en el porcentaje de la germinación asimbiótica así como en el desarrollo normal de las plántulas en condiciones in vitro, por lo que se establecieron alternativas eficientes para ser substituidas.

- Se establecieron sistemas de propagación masiva y clonal de O. stramineum, con el cultivo de protocormos sexuales en medios líquidos en suspensión.

- El incrementar el pH a 5.3 no mostró ser favorable en el desarrollo de plántulas in vitro.

- El mejor desarrollo de plántulas de orquídeas en condiciones in vitro se presentó cuando el medio KC se enriqueció con extractos orgánicos de nopal (O. ficus-indica) o plátano verde (M. paradisiaca).

- Las especies epífitas con tendencia al hábito terrestre (L. aromatica y L. skinneri var. skinneri) no presentaron ningún problema en su adaptación (100% de sobrevivencia) a condiciones de invernadero, plantandolas en sustrato 1:1 de agrolita y hoja de encino triturada.

- Para las especies de hábito estrictamente epífita (ej. O. stramineum) se requiere desarrollar nuevos sistemas de adaptación en condiciones de invernadero (ej. utilizar tallos de encino), debido a que el sustrato utilizado para el género Lycaste no resultó ser favorable para esta especie.

- Se recuperaron in vitro 12 especies de orquídeas mexicanas con diferentes "status" de alteración.

Se logró detener o disminuir el crecimiento por 3 o más años de protocormos y plántulas en condiciones in vitro, sin utilizar subcultivos.

- Fueron reintroducidas en los habitats naturales 3 especies de orquídeas: L. aromatica, L. skinneri var. skinneri y O. stramineum, de las cuales las dos últimas especies se consideran en peligro de extinción.

- Se le hizo un seguimiento en la medida de las posibilidades a las 3 especies liberadas, registrando la sobrevivencia de estas después de 2-3 años de haber sido reintroducidas en el habitat natural.

- Aunque disminuyeron las poblaciones liberadas, efecto debido a que algunos microhabitats seleccionados no fueron del todo adecuados ocasionado principalmente al sepultamiento por la acumulación de hojas además de estar sujetos constantemente a una selección natural por depredadores existentes en el lugar (ej. larvas de lepidópteros) y a las condiciones extremas que prevalecieron en la época de secas (abril-junio de 1988 y 1989) después de su liberación, aunado a la posibilidad de la falta de una simbiosis de micorrizas o al posible parasitismo por los

hongos simbiotes y otros organismo, además a la posible falta de un equilibrio fisiológico y/o genético, esto era de esperarse, ya que las plantas se desarrollaron de la germinación de semillas de las cuales existe una gran diversidad genética, las condiciones controladas del laboratorio (cultivo in vitro) se llega a obtener la germinación y desarrollo de plantas que en forma natural no hubiera sido posible expresarse (ej. plantas albinas), las cuales al ser liberadas en campo es difícil que exista un equilibrio ecológico, de no establecerse puede acarrear un parasitismo e incluso la muerte; reafirmando este concepto, se reporta que en forma natural menos del 5% de las semillas liberadas por una planta pueden alcanzar el estadio adulto, además las orquídeas se caracterizan por crecer en suelos empobrecidos, siendo esto posible a la adecuada simbiosis de micorrizas que presentan con hongos específicos para cada especie. Este análisis nos muestra que las plantas reintroducidas están sujetas en cada momento a una selección de los genes más adaptados a las condiciones extremas a la que fueron sujetas en el hábitat natural. Por lo tanto, es importante desarrollar estudios más profundos en la parte de horticultura (desarrollo y cultivo de las plantas en condiciones de invernadero y liberación en campo) y en la ecología de las plantas silvestres aún existentes en el hábitat natural donde se desea reintroducir las poblaciones obtenidas del cultivo in vitro.

- Se requiere de mayor investigación sobre el establecimiento de la simbiosis de micorriza en plantas obtenidas in vitro: inducción en invernadero o al ser liberadas en su hábitat natural o analizar el establecimiento natural de la

simbiósisis en campo.

- Es de suma importancia generar clonación in vitro, utilizando material somático de plantas existentes en el habitat natural o reserva ecológica protegida donde se desea reintroducir, lo cual permitiría asegurar el genoma de las plantas silvestres, para evitar perdidas por colecta de plantas adultas y que en cierta manera han estado sujetas a una selección por las condiciones naturales, plantas que muy posiblemente han estado dejando descendientes fértiles desde su maduración. Lo anterior, con el tiempo permitiría el intercambio de material genético con las plantas originadas de semillas que logren alcanzar el estado adulto.

- Es importante que las plantas a liberar se les sujete a adaptaciones paulatinas para eliminar la mayor cantidad posible de anomalías fisiológicas que pudieran haber adquirido las plantas durante su cultivo in vitro y en invernadero, lo que permitiría a las plantas, reaccionar ante las condiciones físico-químicas y biológicas del habitat natural; deberan ser capaces entre otras muchas funciones de: regulación hídrica, apertura y cierre de estomas, formación de capas cerosas, el establecimiento de los mecanismos bioquímicos de la síntesis de compuestos que de diferentes maneras puedan jugar un papel importante en contra de sus depredadores o de ciertas condiciones abióticas.

- Para el caso de trabajar con especies que aún es posible encontrar población(es) en condiciones silvestres, es importante conocer la ecología de la especie en cuestión, las cuales facilitarían el cultivo in vitro, en invernadero y su

reintroducción y crecimiento en el habitat natural.

- Es posible que el tamaño (10 a 20 cm) de las plantas reintroducidas sea el adecuado, ya que se puede liberar un número mayor y en un tiempo menor, que el utilizar tallas mayores que incrementarían el costo por planta, además es importante tener una adaptación y selección natural de los diferentes factores naturales que interfieren con la sobrevivencia de la planta en edades más prematuras, ya que tarde o temprano se seleccionaran las que lleguen al estado adulto y dejen descendencia fértil. Aunque cabe aclarar que es importante proteger o revisar periódicamente (por un tiempo no menor de 2 años, para el caso de las orquídeas de lento crecimiento) las plantas en el campo, para evitar que las hojas, ramas que se desprenden de los árboles o la caída de estos las cubran en estados juveniles. Otro factor que puede ser el más importante genética y ecológicamente es el que al liberar plantas que alcancen el estado adulto (floración) en unos cuantos meses (<1 o 2 años) después de su reintroducción, podría permitir la posible aportación de genes para caracteres que resulten en detrimento de la especie (ej. anormalidades genéticas heredables de tipo morfológicas, anatómicas, fisiológicas, bioquímicas, etc.) y que puedan ocasionar la extinción de poblaciones generadas del intercambio genético entre ellas mismas o con las poblaciones silvestres.

- Se requiere de la participación de ecólogos, botánicos, fisiólogos, horticultores y personas amantes de la naturaleza (principalmente de la región de su liberación), lo anterior permitiría mayor colaboración y un mejor conocimiento de cada especie a recuperar (ej. ciclo de vida, relación y magnitud de su

coexistencia con otros organismos y condiciones abióticas del sitio, control de plagas y deshidratación en las primeras etapas de su adaptación y desarrollo de las plantas en campo) esto ayudaría a establecer una participación interdisciplinaria y garantizaría la recuperación de las poblaciones.

- Es importante la aportación de este trabajo en la recuperación de orquídeas amenazadas de extinción, reincorporandolas a la vida silvestre en el habitat natural. Pero es más valioso establecer mejores procedimientos para proteger los ecosistemas declarados reservas naturales, lo que permitiría no incrementar las listas rojas de especies amenazadas, siendo drástico en orquídeas epífitas que dependen de otras especies para su supervivencia.

VII. LITERATURA CITADA

- AMES, O., AND D.S. CORREL, 1953. Orchids of Guatemala. Chicago Natural History Museum, USA. 727pp.
- ANONIMO, 1985. Amer. Orchid Soc. Bull. 54(10): 1244-1304.
- ARDITTI, J., 1966. Orchids. Scientific Amer. 214(1): 70-78.
- _____, 1967. Factors Affecting the Germination of Orchid Seeds. Bot. Rev. 33: 1-97.
- _____, 1977. Clonal Propagation of Orchids by Means of Tissue Culture - A Manual. In: J. Arditti (Ed.), Orchid Biology Reviews and Perspectives, 1. Cornell Univ. Press, Ithaca, New York: 203-293.
- _____, 1990. Lewis Knudson (1884-1958): His Science, His Times, and His Legacy. Lindleyana. 5(1): 1-79.
- _____, M.A. CLEMENTS, G. FAST, G. HADLEY, G. NISHIMURA, AND R. ERNST, 1982C. Orchid Seed Germination and Seedling Culture-A Manual. In: J. Arditti (Ed.), Orchid Biology, Reviews and Perspectives, II. Cornell University Press, Ithaca. 243-270.
- _____, J. D. MICHAUD AND A. P. OLIVA, 1982a. Practical Germination of North American and Related Orchids - I - Epipactis atrorubens, E. gigantea and E. helleborine. Amer. Orchid Soc. Bull. 51 (2): 162-171.
- _____, A. P. OLIVA AND J. D. MICHAUD, 1982b. Practical Germination of American and Related Orchid - II - Goodyera oblongifolia and G. tessellata. Amer. Orchid Soc. Bull. 51 (4): 394-397.
- _____, AND R. ERNST, 1984. Physiology of Germinating Orchid Seeds. In: J. Arditti (Ed.), Orchid Biology: Reviews and Perspectives III. Cornell University Press, Ithaca, New York. 177-222.
- _____, AND C.R. HARRISON, 1977. Vitamin requirements and metabolism in orchids. In: J. Arditti (Ed.), Orchid Biology-Reviews and perspectives, I. Cornell University Press, Ithaca, New York. 157-175.
- _____, J. D. MICHAUD, AND A. P. OLIVA, 1981. Seed Germination of North American Orchids. I. Native California and Related Species of Calypso, Epipactis, Goodyera, Piperia, and Platanthera. Bot. Gaz. 142 (4): 442-453.

- _____, A. OLIVA, AND J. D. MICHAUD, 1985. Practical Germination of North American and Related Orchids - III - Calopogon tuberosus, Calypso bulbosa, Cypripedium Species and Hybrids, Pipcria elegans var. alata, Pipcria maritima, Platanthera hyperborea, and Platanthera saccata. Amer. Orchid Soc. Bull. 54 (7): 859-866.
- ASHTON, P., 1990. Conservation of Biological Diversity in Botanical Gardens. In: E.O.Wilson (Ed.), Biodiversity. National Academy Press, Washington, D.C. 269-278.
- BALBOA, J., 1987. Ganancias Exorbitantes con la deforestación en la Lacandona. La Jornada (18 de junio).
- BIDWELL, R. G. S., 1979. Fisiología Vegetal. AGT EDITOR, México. 784.
- BORREGO, F. Y N. BURGOS, 1986. El Nopal. UAAAN. Saltillo Coah., México. 202pp.
- BOSE, T. K., AND T. P. MUKHERJEE, 1974. Effects of Growth Substances on Seedling Growth and Differentiation from Callus of Vanda in vitro Culture. The Orchid Review. 87 (971): 148-149.
- BRAVO-HOLLIS, H., 1978. Las Cactáceas de México. UNAM, México. 743.
- BURGEFF, H., 1959. Mycorrhiza of Orchids. In: C.L. Withner (Ed.), The Orchids, a Scientific Survey. The Ronald Press, Company New York, 361-395.
- CARABIAS, L.J. Y J. MEAVE DEL CASTILLO, 1987. La Reserva Ecológica del Pedregal de San Angel. Información Científica y Tecnológica (CONACYT), Méx. 9(125):16-19.
- CHAVEZ, A.V.M., 1980. Cultivo Asimbiótico de Bletia urbana Dressler (Orchidaceae) especie endémica del Pedregal de San Angel. Tesis Profesional, Fac. de Ciencias, UNAM. 81.
- CHEE, L. L.-H., 1981. Tissue Culture of Local Orchid Hybrids at the Singapore Botanic Gardens. In: A.N.Rao (Ed.), Symp. on Tissue Culture of Economically Important Plants. Singapore. 295-300.
- CHONG, J.G. AND L.L. HUA, 1978. Effects of Growth Regulators on Morphogenesis of Orchid Callus Tissue. Plant Physiol. 61: 259.
- C.I.T.E.S., 1987. La Convention de Washington L'Application pour les Plantes. Brochure d'information réalisée par le Ministère de l'Agriculture et le WWF-Belgium a.s.b.l. 23.
- CORRELL, D.S., 1950. Native Orchids of North America, North of

- Mexico. Chronica Botanica Company. Waltham, Mass, USA. 1-13.
- DEVLIN, R. M., 1980. Fisiología Vegetal. OMEGA, Barcelona. 517.
- DODDS, J. H. AND L. W. ROBERTS, 1982. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge Univ. Press. Cambridge. 178.
- DRESSLER, L.R. 1981. The Orchids, Natural History and Classification. Harvard University Press. 324pp.
- ECKER, L. 1989. Long Term Maintenance of Desert Diversity: Rare Plant Reintroductions. Agave, 3(3): 6-8.
- EHRlich, P.R. AND P.H. RAVEN, 1967. Butterflies and Plants. Scientific Amer. 216 (6): 104-113.
- ERNST, R. 1967. Effect of Selected Organic Nutrient Additives on Growth in vitro of Phalaenopsis Seedlings. Amer. Orchid Soc. Bull. No.8: 694-704.
- FLANÉE, M., 1978. Influence of selected media and supplements on germination and growth of Paphiopedilum seedlings. Amer. Orchid Soc. Bull. 47: 419-427.
- GAMBORG, O. L., 1982. Callus and Cell Culture, In: L. R. Wether and F. Constabel (Eds.), Plant Tissue Culture Methods. National Research Council. Canada: 1-9.
- _____, R. A. MILLER AND K. OJIMA, 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50: 151-158.
- _____, AND L.R. WETHER, 1975. Plant Tissue Culture Methods. National Research Council, Canada: 1-2.
- GARCIA, P.M. Y M. PEÑA, 1981. Uso de las orquídeas en México desde la época Prehispánica hasta nuestros días. Orquidea (Méx.) 8(1): 59-75.
- GEORGE, E. F. AND P. D. SHERRINGTON, 1984. Plant Propagation by Tissue Culture Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Limited, England. 707.
- GOGINA, E.E., 1979. USSR: The Policies of Botanic Gardens and Their Activities in the Conservation of Threatened Plants. In: H. Syngé and H. Townsend (Eds.), Survival or Extinction. The Bentham-Moxon, Royal Botanic Gardens, Kew. 141-147.
- GOMEZ-POMPA, A., 1985. Los Recursos Bióticos de México: Reflexiones. ALHAMBRA MEXICANA, México. 122.
- GONZALEZ, P.C., 1985. Los Recursos Naturales en Poder de las Transnacionales. Macpalxochitl, Soc. Bot. Méx., México. No. 112.

- GRAEDEL, E.T. AND PAUL J. CRUTZEN, 1989. The Changing Atmosphere. Scientific Amer. 261(3): 28-36.
- HADLEY, G., AND G. HARVAIS, 1968. The Effect of Certain Growth Substances on Asymbiotic Germination and Development of Orchis purpurella. The New Phytologist. 67: 441-445.
- _____, AND G.F. PEGG, 1989. Host-fungus relationships in orchid mycorrhizal systems. In: H.W. Pritchard (Ed.), Modern Methods in orchid Conservation: The role of physiology, ecology and management. Cambridge University Press, New York. 57-71.
- HALL, A.V. AND H.B. RYCROFT, 1979. South Africa: The Conservation Policy of the National Gardens and its Regional Gardens. In: H.Syngé and H. Townsend (Eds.), Survival or Extinction. The Bentham-Moxon, Royal Botanic Gardens, Kew.125-134.
- HARRISON, C.R., AND J. ARDITTI, 1970. Growing orchid from seeds. The Orchid Dig. 7: 199-204.
- HARTMANN T. H. AND D.E. KESTER, 1983. Aseptic Methods of Micro-Propagation. In: Plant Propagation Principles and Practices. Prentice Hall, New Jersey: 523-594.
- HARVAIS, G., 1973. Growth requirements and development of Cypripedium reginae in axenic culture. Can. J. Bot. 51: 327-332.
- HAUSEN, B., 1984. Toxic and Allergenic Orchids. In: J.Arditti (Ed.), Orchid Biology, Reviews and Perspectives, III. Cornell University Press, Ithaca, New York. 216-282.
- HEYWOOD, J.C.V., 1987. Jardines Botánicas, Conservación y Desarrollo. Secretaría para la Conservación en Jardines Botánicas de la IUCN, Kew, 11pp.
- HOPPE, E.-G. AND H.-J. HOPPE, 1988. Tissue Culture of Ophrys apifera. Lindleyana. 3(4): 190-194.
- HUANG, L.-C., 1984. Alternative Media and Method for Cattleya Propagation by Tissue Culture. Amer. Orchid Soc. Bull. 53(2): 167-170.
- HUSEMANN, W., 1984. Photoautotrophic Cell Cultures. In: I.K.Vasil (Ed.), Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Academic Press, Inc., New York. Vol.1: 182-191.
- HUTCHINGS, M., 1989. Population biology and conservation of Ophrys sphegodes. In: H.W.Pritchard (ed.); Modern Methods in Orchid Conservation: The role of Physiology, Ecology and Management. Cambridge University Press, New York. 101-115.
- INTUWONG, O. AND Y. SAGAWA, 1974. Clonal Propagation of Phalaenopsis by Shoot Tip Culture. Amer. Orchid Soc. Bull.

- _____, 1975. Clonal Propagation of Dendrobium Golden Wave and Other Nobile Types. Amer. Orchid Soc. Bull. 319-322.
- IRIONDO, J.M. AND C. PEREZ, 1990. Application of in vitro Culture Techniques to the Conservation of Iberian Endemic Endangered Plant Species. Botanic Gardens Micropropagation News. Junio.4-6.
- I.U.C.N. (International Union for Conservation of Nature), 1983. Rare and Threatened Plant List. Threatened Plant Committee Botanic Gardens Conservation, Coordinating Body, Kew, England.
- _____, 1985. Rare and Threatened Plant List. Threatened Plant Committee Botanic Gardens Conservation, Coordinating Body, Kew, England.
- _____, 1987. Secretaría para la Conservación en Jardines Botánicos, Presentación. Centro de Monitoreo para la Conservación, Kew, Reino Unido.
- JIMENEZ, R., 1990. Oncidium stramineum Batem. ex Lindl. In: E.Hágsater & G.A.Salazar (Eds.), ICONES ORCHIDACEARUM, Orchids of México. Asoc. Méx. Orquideología A.C.
- KARTHA, K.K., 1981. Meristem Culture and Cryopreservation. Methods and Applications. In: T.A.Thorpe (Ed.), Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture. Academic Press, New York: 181-211.
- _____, 1982. Cryopreservation of Germoplasm Using Meristem and Tissue Culture. In: D.T.Tomes, B.E.Ellis, P.M.Harney, K.J.Kasha and R.L.Peterson (Eds.), Application of Plant Cell and Tissue Culture to Agriculture & Industry. University of Guelph, Canada. 139-161.
- KERBAUY, G.B., 1984. Plant Regeneration of Oncidium varicosum (Orchidaceae) by Means of Root Tip Culture. Plant Cell Rep. 3: 27-29.
- KNUDSON, L., 1922. Nonsymbiotic Germination of Orchid Seeds. Bot. Gaz. 73(1): 1-25.
- _____, 1930. Flower Production by Orchid Grow Non-Symbiotically. Bot. Gaz. 89: 192-199.
- _____, 1946. A New nutrient solution for the germination of Orchid seeds. Amer. Orchid Soc. Bull. 15: 214- 217.
- _____, 1948. Clorox and Calcium Hypochlorite as Desinfectants for Orchid Seed. Amer. Orchid Soc. Bull. 17: 348-353.

- _____, 1951. Nutrient solution for Orchid. Bot. Gaz. 112: 258-232.
- KUSOMOTO, M., 1978. Effects of Combination of Growth regulation substances and of organic matter on the proliferation and organogenesis of Cymbidium protocorms cultured in vitro. J. Japan Soc. Hort. Sci. 47: 391-400.
- _____, 1979a. Effects of combination of growth regulators and of organic supplements on the growth of Cattleya plantlets culture in vitro. J. Japan Soc Hort. Sci. 47: 492-501.
- _____, 1979b. Effects of combination of growth regulators and of organic supplements on the proliferation and organogenesis of Cattleya protocorm like bodies cultured in vitro. J. Japan Soc. Hort. Sci. 47: 501-510.
- LABELLE, R., 1987. Ten Years of Work in Agroforestry information and documentation. Agroforestry Systems. 5(3): 339-352.
- LADISLAO, U., 1988. Hallazgo en la selva Lacandona. ICYT(CONACYT). 5-10.
- LE TACON, F., 1985. Las Micorrizas: una cooperación entre plantas y hongos. Mundo Científico. 5(49): 776-784.
- LUCAS G. AND SYNGE, H., 1978. The IUCN Plant Red Data Book, Morges. Switzerland.
- LUGO, E.A., 1988. Estimating Reductions in the Diversity of Tropical Forest Species. In: E.O. Wilson (Ed.), Biodiversity. Washington. Cap. 6: 58-70.
- LUNA R.B.S., 1982. Propagación in vitro de la orquídea Laelia anceps var. alba. Tesis profesional, Fac. de Ciencias (Biología), U.N.A.M. 108 pp.
- LÜNING, B., 1974. Alkaloids of the Orchidaceae. In: C.L. Withner (Ed.), The Orchids Scientific Studies. John Wiley and Sons, New York: 349-382.
- MARTIN, C., 1984. Cultivo de Plantas en Proveta. Mundo Científico. 5(44): 160-169.
- MARTINEZ, P. A., 1985. Inducción in vitro de Brotación Múltiple en Bletia urbana Dressler (Orchidaceae) a partir de Protocormos seccionados. Tesis profesional, Facultad de Ciencias, UNAM. 66.
- _____, 1989. El papel del Cultivo de Tejidos en la Recuperación y Conservación de Especies Vegetales con problemas de Extinción. The Third Regional Conference of the U.S./México Border States On Parks and Wildlife, octubre 25-

28, Mc Allen, Texas.

- _____ AND A. RUBLUO, 1987. In vitro Mass Propagation and Population Recovery of Endangered Tropical Orchids. In: International Congress of Plant Tissue Culture Tropical Species. Bogotá Colombia, septiembre.
- MARTINEZ, E. Y C. H. RAMOS, 1989. Lacandoniaceae (Triuridales): Una nueva Familia de México. Ann. Missouri Bot. Gard. 76(1): 128-135.
- MARTINEZ-VAZQUEZ, O., AND A. RUBLUO, 1989. In vitro mass propagation of the near-extinct Mammillaria san-angelensis Sánchez-Mejorada. Journal of Horticultural Science. 64(1): 99-105.
- MENDOZA, G., 1987. A Mathematical model for Generating land-use allocation alternatives for Agroforestry Systems. Agroforestry Systems. 5(4): 443-453.
- MILLAR, C.E., TURK, L.M. Y H.D. FOTH, 1975. Fundamentos de la Ciencia del Suelo. CECSA, México. 218-223.
- MILLER, E. V., 1981. Fisiología Vegetal. UTEHA. México. 334.
- MIRANDA, F. Y E. HERNANDEZ X., 1963. Los tipos de vegetación en México y su clasificación. Bol. Soc. Bot. Méx. 28: 29-179.
- MOREL, G., 1974. Clonal Multiplication of Orchids. In: Carl, L. Withner (Ed.), The Orchids Scientific Studies. John Wiley and Sons, New York: 169-222.
- MURASHIGE, T., 1974. Plant Propagation Through Tissue Culture. Ann. Rev. Plant Physiol. 25: 135-166.
- _____, 1978. The Impact of Plant Tissue Culture on Agriculture. In: T.A. Thorpe (Ed.), Frontiers of Plant Tissue Culture. IAPTC. Calgary: 15-26.
- MURASHIGE, T. AND F. SKOOG, 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. Physiol Plant. 15: 473-494.
- MYERS, N. 1988. Mass Extinction Profound Problem, Splendid Opportunity. Oryx. 22(4): 205-210.
- NOGGLE, G. R. AND F. L. WYND, 1943. Effects of Vitamins on Germination and Growth of Orchids. Bot. Gaz. 104: 455-459.
- NWONWU, F., 1987. Cost minimization through the use of Taungya System in pulpwood plantation establishment. Agroforestry Systems. 5(4): 455-462.
- OLIVA, A.P. AND J. ARDITTI, 1984. Seed Germination of North American Orchids. II. Native California and related Species

- of Aplectrum, Cypripedium and Spiranthes. Bot. Gaz. 145: 495-501.
- OLIVER, L., 1979. Multiplication and Re-introduction of Threatened Species of the Littoral Dunes in Mediterranean France. In: H.Synge y H.Townsend (Ed.), Survival or Extinction. The Bentham-Moxon, Royal Botanic Gardens, Kew. 91-93.
- OYAMA, N.A.K., 1987. Demografía y Dinámica Poblacional de Chamaedorea tepejilote Liebm. Tesis de Maestría, Fac. Ciencias, UNAM. México.
- PIERSON, L. B., 1969. Ecological Chemistry. Scientific Amer. 220 (2): 22-29.
- POEHLMAN, J. M., 1983. Mejoramiento genético de las cosechas. LIMUSA, México. 453.
- RAGHAVAN, V., 1977. Applied Aspects of Embryo Culture. In: J.Bajaj and Y.P.S. Reinert (Eds.), Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer Verlag, New York. 375-396.
- RAMIREZ, F.M.C., 1990. Establecimiento del Cultivo in vitro de Orquídeas Mexicanas en Peligro de Extinción. Tesis Profesional, Fac. de Ciencias, UNAM. 64.
- RAO, A.N., 1977. Tissue Culture in the Orchid Industry. In: J. Reinert and Y.P.S. Bajaj (Eds.), Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer Verlag, Berlin: 44-69.
- RAVEN, P.H., 1976. Ethics and Attitudes in Conservation of Threatened Plants, NATO Conference Series, 1. Ecology 1: 155-180. Plenum Press, New York.
- REPETTO, R., 1990. Deforestation in the Tropics. Scientific Amer. 262(4): 18-24.
- REYES, C.P., 1983. Bioestadística aplicada. TRILLAS, México. 216pp.
- RUBLUO, A., 1985. Estrategias para la Conservación del Germoplasma Vegetal in vitro. En: El Cultivo de Tejidos Vegetales en México, M.L. Robert y V.M. Loyola (Eds.). CONACYT, México. 35-53.
- _____, V. CHAVEZ AND A. MARTINEZ, 1989. In vitro Seed Germination and Re-introduction of Bletia urbana (Orchidaceae) in its Natural Habitat. Lindleyana. 4(2): 68-73.
- RZEDOWSKI, J., 1978. Vegetación de México. LIMUSA, México. 432.
- _____, 1979. Extinción de especies vegetales. En: Flora

- Fanerogámica del Valle de México. J.Rzedowski y G.C. de Rzedowski (Eds.). CECSA. México. 1: 43-45.
- SAGAWA, Y. AND J.T. KUNISAKI, 1982. Clonal Propagation of Orchids by Tissue Culture. In: A. Fujiwara (Ed.), Proc. 5th Int'l Cong. Plant Tissue and Cell Culture. 683-684.
-
- _____, 1984. Clonal Propagation: Orchids. In: I.K.Vasil (Ed.), Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Academic Press, Inc. New York. 1(8): 61-67.
-
- _____, AND T. SHOJI, 1967. Clonal Propagation of Dendrobium spp. Through Shoot Meristem Culture. Amer. Orchid Soc. Bull. 36(10): 856-859.
- SAKUTA, M. AND A. KOMAMINE, 1987. Cell Growth and Accumulation of Secondary Metabolites. In: I.K.Vasil (Ed.), Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Academic Press, Inc. New York. vol.14: 97-114.
- SALAZAR, G., 1990. Lycaste aromatica (Graham ex Hook.) Lindl. In: E.Hágsater & G.A.Salazar (Eds.), ICONES ORCHIDACEARUM, Orchids of Mexico. Asoc. Méx. Orquideología A.C.
- SANCHEZ-MEJORADA, H.R., 1979. Saqueo de Cactáceas Mexicanas Aprovechando las Excursiones de Turistas. Cact. Suc. Mex. 24: 75-77.
-
- _____, 1982a. Problemas en el Control del Comercio de las Cactáceas. Cact. Suc. Méx. 26: 6-9.
-
- _____, 1982b. Informe sobre la Reunión de Tucson para analizar el Comercio de Cactáceas. Cact. Suc. Méx. 27: 90-95.
- SANCTON, A.T., 1989 Hands Across the Sea. TIME. 133(1): 32-36.
- SCHILDE-RENTSHLER, L., N. ESTRADA, R. ESPINOZA AND R. LIZARRAGA, 1982. In vitro Storage and distribution of potato germplasm. In: A. Fujiwara (Ed.), Plant Tissue Culture, Tokyo. 781-782.
- SCHNEIDER, H.S., 1989. The Changing Climate. Scientific Amer. 261(3):38-47.
- SCHULTES, R.E., 1990. Medicinal Orchids of the Indians of the Colombian Amazon. Amer. Orchid Soc. Bull. 59(2): 159-161.
- SHERIDAN, W. F., 1975. Plant Regeneration and Chromosome Stability. In: L. Ledoux (Ed.), Genetic Manipulation with Plant Material. Plenum Press, New York: 263-295.
- SNEDECOR, W.G. Y W.G. COCHRAN, 1978. Métodos estadísticos. CECSA, México. 703 pp.
- SNOW, R., 1985. Improvements in Methods for the Germination of

Orchid Seeds. Amer.Orchid Soc. Bull. 54(2): 178-181.

- SOTO, A.M.A., 1988. Listado actualizado de las orquídeas de México. Orq.(Méx.). 11: 233-277.
- STEWART, J., 1989. Orchid propagation by tissue culture techniques - past, present and future. In: H.W.Pritchard; Modern Methods in Orchid Conservation: The role of Physiology, Ecology and Management. Cambridge University Press, New York:87-100.
- _____, 1990. A Letter From Lausanne. Amer. Orchid Soc. Bull. 59(1): 25-35.
- STOLARSKI, S.R., 1988. The Antarctic Ozone Hole. Scientific Amer. 258(1): 30-36.
- STOUTAMIRE, W., 1974. Terrestrial orchid seedling. In: C.L. Withner (Ed.), The Orchids: Scientific studies. Wiley-Interscience, New York. 101-128.
- STRAUSS, M.S., AND D.M. REISINGER, 1976. Effects of naphthaleneacetic acid on seed germination. Amer. Orchid Soc. Bull. 45: 722-723.
- TANAKA, M. AND Y. SAKANISHI, 1977. Clonal Propagation of Phalaenopsis by leaf Tissue Culture. Amer. Orchid Soc. Bull. 46: 733-737.
- THOMPSON, P.A., 1977. Orchids from Seed. Royal Bot. Gardens, Kew, Ltd. London. 1-29.
- TOLEDO, V.M., 1988. Protegiendo la Biodiversidad: Las áreas protegidas de México. Simposio sobre la Diversidad Biológica de México. 3-7 de octubre, Oaxtepec Morelos, México.
- _____, AND J. ORDOÑEZ, 1990. The Biodiversity Scenary of México: A Review of Terrestrial habitats. (En prensa). In: T.P. Ramamoorthy et al. (Eds), Biological Diversity of México. Oxford Univ. Press.
- VACIN, E.F., AND F. WENT, 1949. Some pH changes in nutrient solutions. Bot. Gaz. 110: 605-613.
- VAZQUEZ, Y.C. Y A.S.OROZCO, 1989. La destrucción de la Naturaleza. Fondo de Cultura Económica, Colección La Ciencia desde México No.83, México.
- VILLA-LOBOS, J., 1988a. Threatened Plant List of Middle America. IUCN.
- _____, 1988b. Conservación y Biodiversidad. Boletín de las Plantas Amenazadas, I.U.C.N./W.W.F. No. 19: 2-5.
- _____, 1988c. Canje de Deudas. Boletín de las Plantas

Amenazadas, I.U.C.N./W.W.F. No. 19: 5-6.

- VOVIDES, A., 1979. Practical Conservation Problems of a New Botanic Garden. In: H. Synge y H. Townsend (Eds.), *Survival or Extinction. The Bentham-Moxon, Royal Botanic Gardens, Kew.* 117-123.
- _____, 1981. Lista Preliminar de Plantas Mexicanas Raras o en Peligro de Extinción. *Biótica*, 6 (2): 219-228.
- _____, 1988. Relación de Plantas Mexicanas Raras o en Peligro de Extinción. En: *Conservación en México: Síntesis sobre Vertebrados Terrestres, Vegetación y uso del Suelo*, O. Flores Villela y P. Gerez (Eds.). INIREB, Conservación Internacional. México. 289-302.
- WEAVER, R.J., 1984. Reguladores del Crecimiento de las Plantas en la Agricultura. *Trillas, México.* 622.
- WHITE, M.R., 1990. The Great Climate Debate. *Scientific Amer.* 263(1): 18-25.
- WILSON, E.O., 1985. The Biological Diversity Crisis. *Bioscience.* 35(11): 700-706.
- _____, 1989. Threats to Biodiversity. *Scientific Amer.* 261(3): 60-66.
- WITHNER, C.L., 1959. Orchid Physiology. In: Carl L. Withner (Ed.), *The Orchids: A Scientific Survey.* Ronald Press, New York. 315-360.
- _____, 1974. Developments in Orchid Physiology. In: C.L. Withner (Ed.), *The Orchids Scientific Studies.* John Wiley and Sons, New York: 129-168.
- WOCHOK, Z. S., 1981. The Role of Tissue Culture in Preserving Threatened and Endangered Plant Species. *Biological Conservation.* 20: 83-89.
- WOLF, C.E., 1988. Avoiding a Mass Extinction of Species. *State of the World.* 101-117.
- WOODWELL, M.G., 1978. La cuestión del dióxido de carbono. *Investigación y Ciencia.* No. 18: 16-26.
- WRIGLEY, J.W., 1979. The Cultivation of Native Endangered Plants in Canberra Botanic Gardens. In: H. Synge and H. Townsend (Eds.), *Survival or Extinction. The Bentham-Moxon, Royal Botanic Gardens, Kew.* 101-105.

PARTICIPACIONES Y PUBLICACIONES PARCIAL DE LOS RESULTADOS DE LA PRESENTE INVESTIGACION:

- MARTINEZ-PALACIOS, A., C.M.RAMIREZ Y A.RUBLUO, 1986. Recuperación in vitro de Poblaciones de las Orquídeas Encyclia vitellina (Lindley) Dressler, Lycaste skinneri Lindley, Mormodes ramirezzi Rosillo, y Odontoglossum ehrenbergii Link, Klotzch y Otto, Amenazadas de Extinción. En: Reunión Anual Académica, Instituto de Biología, U.N.A.M. México. (resúmen).
- MARTINEZ-PALACIOS,A., 1987. Propagación Masiva y Recuperación in vitro de Poblaciones de Orquídeas en Peligro de Extinción. En: II Congreso Nacional de Horticultura. Irapuato, Gto. México. (resúmen).
- MARTINEZ-PALACIOS, A. AND A. RUBLUO, 1987. In vitro Mass Propagation and Population Recovery of Endangered Tropical Orchids. In: International Congress of Plant Tissue Culture Tropical Species. Bogotá, Colombia, SudAmérica. (Abstracts).
- MARTINEZ-PALACIOS,A., Y V.CHAVEZ, 1989. Modelo de Germinación Asimbiótica in vitro para Semillas de Orquídeas. En: I Coloquio de Biotecnología de las Plantas y III Simposio Internacional sobre Sanidad Vegetal. Santa Clara, Cuba. (resúmen).
- RUBLUO, A., V. CHAVEZ, A.P. MARTINEZ AND MARTINEZ-VAZQUEZ, 1991. Strategies for the Recovery of Endangered Orchids and Cacti Through in vitro Culture. Biological Conservation. (en prensa).

APENDICE 1. MEDIO DE CULTIVO KNUDSON "C" (KC) 1946.

NUTRIMENTOS	SOL. CONCENTRADA	
	mg/l	10 x
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	1000.0	*
KH ₂ PO ₄	250.0	2500
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	250.0	2500
(NH ₄) ₂ SO ₄	500.0	5000
MnSO ₄ · 4H ₂ O	7.5	75
FeSO ₄ · 7H ₂ O	25.0	*
Sacarosa	20,000.0	
pH	5.0	
SOLIDIFICANTE		
Agar	8000.00	

APENDICE 2. MEDIO DE CULTIVO VACIN & WENT (VW) 1949.

NUTRIMENTOS	SOL. CONCENTRADA	
	mg/l	10 x
Ca ₃ (PO ₄) ₂	200.0	*
KNO ₃	525.0	5250
KH ₂ PO ₄	250.0	2500
MgSO ₄ · 7H ₂ O	250.0	2500
(NH ₄) ₂ SO ₄	500.0	5000
MnSO ₄ · 4H ₂ O	7.5	75
Fe ₂ (C ₄ H ₁₀ O ₆) ₃ · 2H ₂ O (Tartrato ferrico)	28.0	*
Sacarosa	20 000.0	
pH	5.0	
SOLIDIFICANTE		
Agar	8000.0	

El pH 5.0 se ajusta despues de aforar y antes de agregar el agar con HCl y/o KOH a 0.1 y 0.5 N.; (*) pesar y agregar en orden al preparar el medio.

APENDICE 3. MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE Y SKOOG (MS) 1962.

SOLUCION CONCENTRADA	NUTRIMENTOS	mg/l	10X (mg/l)
	MACRONUTRIMENTOS		
(I)	NH ₄ NO ₃	1,650.0	16,500.00
10 lts X 200 ml	KNO ₃	1,900.0	19,000.00
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370.0	3,700.00
	KH ₂ PO ₄	170.0	1,700.00
(II) 10 lts X 100 ml	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440.0	4,400.00
(III)	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	2,780.00
10 lts X 100 ml	Na ₂ EDTA	37.3	3,730.00
	MICRONUTRIMENTOS		
	KI	0.83	8.30
	H ₃ BO ₃	6.2	62.00
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	223.00
(IV)	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.3	83.00
10 lts X 100 ml	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	2.50
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.25
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.25
(V) 10 lts X 100 ml	INOSITOL	100.0	1,000.00
	VITAMINAS		
(VI)	Ac. nicotínico	0.5	5.00
10 lts X 100 ml	Piridoxina.HCl	0.5	5.00
	Tiamina.HCl	0.1	1.00
	AZUCAR		
	Sacarosa	30,000.00	
	SOLIDIFICANTE		
	Agar	8,000.00	

Despues de aforar y antes de agregar el agar, ajustar el pH a 5.7 con KOH y/o HCl a 0.1 o 0.5 N.

APENDICE 4. KC-E = MEDIO KNUDSON "C" (1946) ENRIQUECIDO EN LA PRESENTE
 INVESTIGACION PARA LA GERMINACION MASIVA DE ORQUIDEAS.

No	COMPONENTES	mg/l
1	<u>MACRONUTRIMENTOS</u>	
a	Nitrato de calcio, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1000.00
b	Fosfato monobásico de potasio, KH_2PO_4	250.00
c	Sulfato de magnesio, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250.00
d	Sulfato de amonio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	500.00
e	Sulfato de manganeso, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	7.50
f	Sulfato ferroso, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	25.00
2	<u>MICRONUTRIMENTOS</u>	
a	Acido bórico, H_3BO_3	0.056
b	Acido molibdico, MoO_3	0.016
c	Sulfato cúprico, anhidro, CuSO_4	0.040
d	Sulfato de Zinc, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.331
e	Ioduro de potasio, KI	0.083
f	Cloruro de cobalto, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0025
3	<u>VITAMINAS B5</u> (Gamborg et al., 1968)	
a	Acido nicotínico	1.00
b	Piridoxina-HCl	1.00
c	Tiamina-HCl	10.00
4	Myo-inositol	100.00
5	Sacarosa	20000.00
6	Agua destilada * aforar a	1000 ml
7	Agar bacteriológico	8-12 gr

* Después de aforar y antes de agregar el agar, ajustar el pH a 5.0 con KOH y/o HCL a 0.1 y 0.5 N.

APENDICE 5. BARRIDO HORMONAL Y pH PARA LA INDUCCION DE ENRAIZAMIENTO Y DESARROLLO DEL BROTE (20 mm) DE Bietia urbana DRESSLER.

TRATAMIENTO *	REGULADOR GA ₃ μM	DEL	CRECIMIENTO BAμM	ANApM
A	0		0	0
B	0		0	1
C	0		0	5
D	0		5	0
E	0		5	1
F	0		5	5
G	5		0	0
H	5		0	1
I	5		0	5
J	5		5	0
K	5		5	1
L	5		5	5
M	0		0	0

(*)= Todos los tratamientos estaban a pH 5.3, a excepción del M (pH 5.0).

APENDICE 6.

Preparación de fitohormonas, soluciones concentradas 10^{-3} M.

Para preparar las soluciones concentradas de cada una de las fitohormonas, fue importante conocer el peso molecular, por lo tanto:

Fitohormona	P.M.	10^{-3} M g/l	Stock 10^{-3} M g/100 ml
ANA	186.2	0.1862	0.01862
BA	225.2	0.2252	0.02252
GA ₃	346.38	0.34638	0.034638

Auxinas, ej. ANA: una vez pesado 18.62 mg, para 10^{-3} M en una solución concentrada de 100 ml, primeramente se disolvió en unas gotas (1-2 ml) de etanol 100%, se calentó ligeramente (40°-50°C), y diluyó gradualmente con agua destilada hasta 40-50 ml, se aforó en un matraz volumétrico de 100 ml, se guardó en un frasco obscuro y se conservó en refrigeración (4° a 10°C).

Citocininas, ej. BA: una vez pesado 22.52 mg., para preparar 10^{-3} M en una solución concentrada de 100 ml, primeramente se disolvió en unas gotas (1 ml) de HCl 0.5 N, se agitó y calentó (40°-50°C) y se diluyó gradualmente hasta 40 o 50 ml, se aforó con agua destilada en un matraz volumétrico de 100 ml, se guardó en un frasco obscuro y se conservó en refrigeración (4°-10°C).

Giberelinas, ej. GA₃: 34.638 mg para preparar 10^{-3} M en solución concentración de 100 ml, la hormona se disolvió en agua destilada, calentando ligeramente y agitando durante 15 minutos, se aforó y se almacenó de igual manera que auxinas y citocininas.

Esta fitohormona no se almacenó por más de 30 días, debido a que reduce su efecto, se guardó en obscuridad por ser fotolábil. Se agregó por filtración después de que el medio se autoclaveó y registraba una temperatura de 60°C aproximadamente, debido a que la fitohormona es termolábil (Dodds y Roberts, 1982).

Forma de adicionar la fitohormona al medio de cultivo.

Para calcular las alícuotas de fitoreguladores, correspondientes a los medios de cultivo, se usó la formula:

$$V_1 C_1 = V_2 C_2$$

V₁ = cantidad (ml) a agregar de la hormona,

C₁ = solución concentrada 10^{-3} M,

V₂ = volumen (ml) de medio nutritivo a preparar, y

C₂ = concentración hormonal que se desea en el volumen de medio a preparar. Ej. si se prepara un litro de medio con 5 [µM] de BA, se tiene:

$$V_1 = \frac{(1000 \text{ ml}) (5 \times 10^{-6} \text{ M})}{10^{-3} \text{ M}} = (1000 \text{ ml}) (5 \times 10^{-3} \text{ M}) = 5 \text{ ml}$$

APENDICE 6A.

F. Preparación de Extractos Orgánicos.

Los medios nutritivos se enriquecieron con uno de tres diferentes extractos orgánicos: plátano, agua de coco y nopal, para el caso de los dos primeros, se utilizaron en sus dos estadios fisiológicos, inmaduro y maduro, en todos los casos los vegetales fueron adquiridos en el mercado local.

F.1 El agua de coco (Cocos nucifera L.), endospermo líquido, se exploró con 2 estadios fisiológicos, inmaduro y maduro; el criterio de estadio inmaduro fue basado en la condición del endospermo totalmente líquido, y para el maduro, cuando presentaba una capa consistente de 0.5 cm de grueso.

El coco se abrió y se extrajo el líquido, el cual se filtró en gasa, posteriormente se calentó en una parrilla hasta su ebullición durante 10 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente para permitir la precipitación de las proteínas. Finalmente se filtró con papel Whatman 1 (Dodds and Roberts, 1982) y se midió en una probeta la cantidad adecuada para lograr la concentración deseada en los medios de cultivo (20 por ciento v/v).

F.2 El plátano Tabasco (Musa paradisiaca Lour.), se utilizó en dos estadios fisiológicos, inmaduro y maduro; el primero, aunque del mismo tamaño del segundo presentaba la cáscara o cubierta de color verde, difícil de desprender y el fruto de consistencia dura y pegajosa; el plátano maduro con cascara de color amarillo sin manchas de una madurez muy adelantada.

Del plátano, se retiró la cáscara, se pesó en una balanza granataria la cantidad necesaria para lograr en el medio de cultivo, la concentración de 10 % p/v, se licuó adicionando agua destilada, y se agregó en ésta forma al medio nutritivo (tabla 3).

F.3 Extracto de Nopal (Opuntia ficus-indica (L.) Miller, se utilizaron tallos (cladodios) jóvenes de menos de 6 meses de edad y con 15 cm de largo, se lavaron con agua destilada, se licuaron en 100 a 200 ml de agua destilada por cada 100 o 200 gr de nopal y el extracto se adicionó al medio de cultivo en 15% p/v (tabla 3).



SECRETARIA DE AGRICULTURA
Y
RECURSOS HIDRAULICOS

DEPENDENCIA Cd. Victoria, Tamps.
NUMERO DEL OFICIO 22676
EXTENSIÓN AB42133

ASUNTO: Exportación de plantas y semillas silvestres. Cactus, Cycadías, A. Orquídeas, Euphorbias, Aloes.

Certifico, que esto no pone en y extinción de las especies antes mencionadas; y no es en contra de ley de MEXICO.

Junio. 26. 1985

Esta dependencia da permiso Roger Erostowicz, la exportación de plantas y semillas silvestres antes mencionadas, de las cuales serán las siguientes:

- 300,000 (trescientos mil) plantas de cactus.
- 1,000 (un mil) kilogramos de semillas de cactus.
- 200,000 (doscientos mil) plantas de Cycadías.
- 10,000 (diez mil) kilogramos de semillas de Cycadías.
- 100,000 (cien mil) plantas de Orquídeas.
- 50,000 (cincuenta mil) plantas de Euphorbias.
- 50,000 (cincuenta mil) plantas de Aloes.

Importador, Roger Erostowicz, tiene un tiempo de 6 (seis) meses a partir de la presente fecha (Junio. 26. 1985)

Salinas Canales

Jefe del Sector Forestal
Cd. Victoria, Tamps.

Ing. Salinas Canales J.

AL COMISARIO ESTE OFICIO, ENTREGAR
LOS DOCUMENTOS QUE SE ENVIAN EN EL
DADO DEL ANGLICO JUNIOR GENERAL.

S. A. R. H.



S. A. R. H.





NUMERO DEL OFICIO
EXPEDIENTE

SECRETARIA
DE
AGRICULTURA Y
RECURSOS HIDRAULICOS

ASUNTO:

EXPORTACION DE PLANTAS A LOS ESTADOS UNIDOS

TITULAR DEL APROVECHAMIENTO: Sr. Elbert Raper

DOMICILIO:

Rt. 2, Box 545-B, Brownsville,
Texas.

PRODUCTO: CACTI, CYCADS,
ORCHIDS, AGAVE VICTORLAE
REGINAE, AGAVE VICTORLAE
REGINAE COMPACTA Y FOULIERIA
COLUMARIIS

ESPECIE: CACTI, CYCADS, ORCHIDS,
AGAVE VICTORLAE - REGINAE, AGAVE
VICTORLAE - REGINAE COMPACTA Y
FOULIERIA COLUMARIIS

FICHA FORESTAL JURISDICCIONAL: C. Victoria, Tamaulipas

CLASE DE ESTUDIO: CACTI, CYCADS Y ORCHIDS

MEDIO DE TRANSPORTE: Camion LUGAR DE EMBARQUE: C. Victoria,
Tamaulipas

LUGAR DE DESTINO: Brownsville, Texas

NO HAY PELIGRO DE EXTINCION

LIQUIDACION FORESTAL:

Cantidad Aprobada en el Estudio	100,000
Cantidad Autorizada en esta guia	100,000

75 de Septiembre 1985
Fecha de Expedición:
Revisado por

Técnico Forestal

Elbert Raper
Firma del Titular del Aprovechamiento

El Jefe de Oficina
Administrativa



SECRETARÍA DE
AGRICULTURA Y
RECURSOS HIDRÁULICOS

DIRECCION GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

CERTIFICADO PARA LA EXPORTACION DE VEGETALES

De conformidad con lo dispuesto en el Artículo 26, Fracción III de la Ley de Sanidad Fitopecuaria de los Estados Unidos Mexicanos de fecha 13 de Diciembre de 1974.

DESCRIPCION DEL PRODUCTO

Nombre del Producto OCUNIA BIGELAYII Estado del Producto SECO
 Procedencia NAVIDAD, N.L. Cantidad 2,000 KILOS
 Exportador LUCIANO GUERRA Valor \$ 20,000.00 M.N.
 Destinatario EL MISMO Agente Aduanal _____
 Destino TEXAS Núm. de Pedimento _____
 Núm. y Clase de Embarque 4,000 pzas. Permiso Núm. _____
 Transporte Utilizado CAMION

OBSERVACIONES: MATERIA MUERTA, NO AFECTA EL INDICE DE RECURSOS FORESTAL

H. MATAMOROS, Tam., a 01 ABRIL de 1986.

El Inspector



SECRETARIA DE AGRICULTURA
Y
RECURSOS HIDRAULICOS

ASUNTO:

EXPORTACION DE PLANTAS A LOS ESTADOS UNIDOS

TITULAR DEL APROVECHAMIENTO: Sr. Elbert Raper
 DOMICILIO: Rt. 2, Box 545-B, Brownsville,
 Texas
 PRODUCTO: CACTI, CYCADS,
 ORCHIDS, AGAVE VICTORLAE,
 REEDER, AGAVE VICTORLAE
 REEDER COMPACTA Y FOQUIERA
 COLASIFRIS
 ESPECIE: CACTI, CYCADS, ORCHIDS,
 AGAVE CITRORLAE - REEDER, AGAVE
 VICTORLAE - REEDER COMPACTA Y
 FOQUIERA COLASIFRIS

OFICINA FORESTAL JURISDICCIONAL: C. Victoria, Tamaulipas

CLASE DE ESTUDIO: CACTI, CYCADS Y ORCHIDS

MEDIO DE TRANSPORTE: Camion LUGAR DE EMBARQUE: C. Victoria,
 Tamaulipas

JUN 13 1986 RE
 [Signature]
 U. S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE
 FOREST AND RANGELAND SERVICE
 BUREAU OF PLANT INDUSTRY

LUGAR DE DESTINO: Brownsville, Texas

NO HAY PELIGRO DE EXTINCION

CACTACEAE : CITES II

1 Astrophytum myriost

1 Mammillaria parkens

(both were crests)

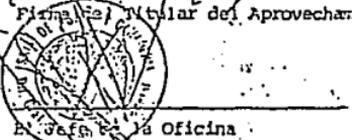
LIQUIDACION FORESTAL:

Cantidad Aprobada en el Estudio 100,000
 Cantidad Autorizada en esta guia 100,000

01 de Abril 1986
 Fecha de Expedición:
 Revisado por

[Signature]
 Técnico Forestal

[Signature]
 Elbert Raper
 Titular del Aprovechamiento



DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA
 SECRETARIA DE AGRICULTURA Y RECURSOS HIDRAULICOS



SECRETARÍA DE AGRICULTURA
Y
RECURSOS HIDRÁULICOS

ASUNTO:

EXPORTACION DE PLANTAS A LOS ESTADOS UNIDOS

TITULAR DEL APROVECHAMIENTO: Sr. Elbert Raper
 DOMICILIO: Rt. 2, Box 545-D, Brownsville,
 Texas
 PRODUCTO: CACTI, CYCADS, ESPECIE: CACTI, CYCADS, ORCHIDS,
 SPECIES, AGAVE VICTORIAE AGAVE CITRORIAE - REGINAE, AGAVE
 REGINAE, AGAVE VICTORIAE VICTORIAE - REGINAE COMPACTA Y
 LESSEE COMPACTA Y FOQUIBIA FOQUIBIA COLANTIGRIS
 COLANTIGRIS

OFICINA FORESTAL JURISDICCIONAL: C. Victoria, Tamaulipas
 CLASE DE ESTUDIO: CACTI, CYCADS Y ORCHIDS
 MEDIO DE TRANSPORTE: - Camión LUGAR DE EMBARQUE: C. Victoria,
 Tamaulipas
 LUGAR DE DESTINO: Brownsville, Texas

NO HAY PELIGRO DE EXTINCION

CUANTIFICACION FORESTAL:

Cantidad Aprobada en el Estudio	100,000
Cantidad Autorizada en esta guía	100,000

de Abril 1986
 Fecha Expedición:
 Fecha Por

[Signature]
 Jefe Oficina Forestal

[Signature: Elbert Raper]
 Firmado por el Titular del Aprovechamiento
 El Jefe de la Oficina

DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA
 Y RECURSOS HIDRÁULICOS



SECRETARIA

DE

AGRICULTURA Y GANADERIA

DEPENDENCIA

NUMERO DEL OFICIO
EXPEDIENTE

APENDICE 12

ASUNTO:

ACUERDO que declara de utilidad pública la conserva-
ción y mejoramiento de las orquídeas y cactáceas silves-
tres.— Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice:
Estados Unidos Mexicanos.—Presidencia de la República.

ACUERDO A LA SECRETARIA DE AGRICULTURA Y
FOMENTO.

CONSIDERANDO.— Que el irracional aprovechamiento de
orquídeas y cactáceas silvestres con fines comerciales y
lucrativos ha degenerado en explotaciones immoderadas que
han determinado la extinción de importantes especies pre-
sias de México, y amenazando la desaparición de otras, --
con fundamento en lo que dispone el artículo 41 de la Ley
Forestal en vigor, he tenido a bien dictar el siguiente:

ACUERDO:

1/o.— Considerase de interés público la conserva-
ción y mejoramiento de las riquezas fore tales, como las
orquídeas y cactáceas silvestres.

2/o.— Sólo se concederá autorización para la expor-
tación de las mencionadas plantas a las personas que con
anterioridad hayan solicitado y obtenido el permiso co-
rrespondiente de la Dirección Forestal y de Caza, para
la recolección y propagación de especies previamente fi-
jadas, comprobando además tener especies de las mismas.

3/o.— La misma autorización a que se refiere el --
artículo anterior será otorgada a las personas que con-
ose fin se dediquen al cultivo y propagación de orquídeas
y cactáceas que tengan establecimientos adecuados en los
que se desarrollen propiamente labores de cultivo y propa-
gación de las mismas.

4/o.— Las autorizaciones a que se refieren los pá-
rrafos 2º y 3º, se entenderán independientemente de los
impuestos fiscales que fijan las Autoridades Federales,
así como las medidas aduanales que se estime necesarias
para el debido control, cuando se trate de exportaciones.

5/o.— Quedan suspendidas hasta nueva orden, por lo
que respecta a orquídeas y cactáceas, las disposiciones --
de los artículos segundo, quinto sexto, séptimo, noveno y



SECRETARIA

DE

AGRICULTURA Y GANADERIA

DEFINICION

NUMERO DEL OFICIO
EXPEDIENTE

ASUNTO:

décimo del acuerdo que reglamenta la recolección y explotación de plantas, frutos y semillas.

6/o.- Este acuerdo entrará en vigor quince días después de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

Dado en la ciudad de México, D.F. a los 19 días del mes de junio de 1940.-El Presidente Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos, Lázaro Cárdenas.-Rúbrica. El Secretario de Agricultura y Fomento, José O. Parras.-Rúbrica.

Publicado en el Diario Oficial de jueves 29 de agosto de 1940.-Tomc. XXI.-No. 52.