



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



**"GERMINACION ASIMBIOTICA DE SEMILLAS DE ORQUIDEA
in vitro (Catasetum sp.)"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRICOLA
P R E S E N T A :
JOSE LUIS GARCIA HORTA

ASESOR: ING. FRANCISCO CRUZ PIZARRO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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

Página

Resumen	1
Indice de cuadros	11
Indice de figuras	111
I.- Introducción	1
II.- Objetivos	2
III.- Revisión de literatura	3
3.1 Importancia de la familia Orchidaceae	3
3.2 Características botánicas	5
3.2.1 Las Flores	5
3.2.2 Partes vegetativas	11
3.2.3 Raíces	12
3.2.4 Características de <u>catasetum sp.</u>	12
3.2.5 Clasificación taxonómica	14
3.3 Propagación <u>in vitro</u>	15
3.3.1 Fases o estados del cultivo de tejidos	17
3.3.2 Ventajas del cultivo de tejidos	21
3.4 Cultivo de ebriones	23
3.4.1 Fenología de la fertilización en las Orquídeas	23
3.5 Reproducción de Orquídeas a partir de semillas	29
3.6 Desarrollo del embrión durante la germinación	34
3.7 Factores que intervienen en la germinación de las semillas	37
3.7.1 Efecto y utilización de carbohidratos	37
3.7.2 Fuentes de nitrógeno	42
3.7.3 Nutrición mineral	43
3.7.4 Lípidos	45
3.7.5 Fotosíntesis	46
3.7.6 Factores ambientales	46
3.7.7 Iluminación	47
3.7.8 Temperatura	49
3.7.9 pH	49
3.7.10 Vitaminas	49
3.7.11 Hormonas	50
3.7.12 Complejos aditivos	54
3.7.13 Rayos gamma	54
3.7.14 Formación de protocormos	54
3.7.15 Protocormo de germinación	55

IV.-	Materiales y métodos	56
4.1	Ubicación del experimento	56
4.2	Material vegetal empleado	56
4.3	Diseño experimental	56
4.4	Medio de cultivo	56
4.5	Desinfección y siembra de las semillas	56
4.6	Condiciones de incubación	57
4.7	Toma de datos	57
4.8	Fecha de siembra	58
V.-	Resultados y discusión de resultados	60
VI.-	Conclusiones	70
	Bibliografía	72

RESUMEN

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Se utilizaron cápsulas abiertas de catasetum sp. las cuales fueron donadas por Institutos de Investigación de la propia UNAM. El medio de cultivo empleado fué el de Murashige y Skoog al 50% de su concentración de sales minerales.

Para promover el proceso de germinación se suplementó al medio de cultivo reguladores de crecimiento (auxinas, citocinias) y agua de coco, de esta manera el experimento se montó sobre un diseño completamente al azar el cual se formó con 6 tratamientos y 6 repeticiones cada uno.

Los porcentajes obtenidos de germinación por tratamientos son como a continuación se enlistan:

- 1.- 36.18 %
- 2.- 34.04 %
- 3.- 27.83 %
- 4.- 33.58 %
- 5.- 31.99 %
- 6.- 68.17 % (testigo)

Del análisis estadístico se obtuvo que existe una diferencia altamente significativa del testigo en comparación con los demás tratamientos.

INDICE DE CUADROS

Cuadro No.		Página
1	Período de maduración seminal de Orquídeas	8
2	Cantidad de semillas en cápsulas de diferentes Orquídeas	10
3	Especies multiplicadas <u>in vitro</u>	16
4	Análisis del carbón activado basado en su peso	48
5	Organización del experimento	58
6	Medio de cultivo de Murashige y Skoog	59
7	Análisis de varianza y prueba de Tukey	66
8	Prueba de Tukey	66

INDICE DE FIGURAS

Figura No.		Página
1	Micropropagación de Orquídeas en Noruega Durante 1980 - 1988	4
2	Estructura clásica de una flor de Orquídea	6
3	Formas de la semilla de algunas Orquídeas y la del embrión en crecimiento	24
4	Crecimiento de la seilla de Orquídea <u>cataetum sp.</u>	36
5	Efecto de diferentes carbohidratos sobre semillas de <u>cattleya sp.</u>	40
6	Crecimiento de plantas de <u>cattleya sp.</u> con sacarosa esterilizadas en autoclave y por frío	41
7	Porcentaje de germinación con semillas de <u>Gataetum sp</u>	65
8	Porcentaje de contaminación obtenido en el experimento	69

I.- INTRODUCCION

En México, la horticultura ornamental es considerada una actividad productiva que en los últimos años se ha incrementado, según diferentes referencias, se menciona que actualmente se dedican de 3,500 a 5,000 hectáreas aproximadamente, proyectándose un rápido crecimiento para los próximos años.

En estudios realizados por el sector privado y oficial se revela que México mantiene una posición privilegiada en algunos mercados extranjeros al contribuir con sus exportaciones agrícolas con especies importantes como: Crisantemo, Clavel, Gladiola, Rosa y últimamente las Orquídeas como flor de corte y en maceta.

Hoy en día la horticultura emplea nuevas técnicas para la producción de un número considerable de plantas con flor, cada país dedica por tradición o por desarrollo económico más atención a ciertas especies ya sea nativas o adaptadas y tomando en cuenta que para cultivarlas se deben considerar los efectos del clima y del ambiente, por ejemplo, Donal F.,1992; reporta que la industria Hawaiana de las Orquídeas alcanzó ganancias superiores a los 11 millones de dólares en el año de 1992. Es importante mencionar que la gran rentabilidad que se tiene en el cultivo de las Orquídeas hace que los productores de éstas plantas se interesen por técnicas de cultivo que aseguren la producción de cantidades significativas en lapsos relativamente cortos, en comparación con los métodos tradicionales de multiplicación.

Cabe destacar que la mayoría de las Orquídeas no son oriundas de Hawai como muchas personas lo creen, estas plantas provienen de Sudamérica y de la parte tropical de Asia, aunque las variedades más vistosas provienen de las zonas tropicales, las Orquídeas se encuentran en casi todas las partes del mundo excepto el Polo Norte y algunas zonas desérticas.

Entre las técnicas que son empleadas para multiplicar esta especie destacan las siguientes:

- Hibridación de Orquídeas.
- Propagación por medio de esquejes.
- Cultivo in vitro de Orquídeas:
 - Cultivo de meristemas.
 - Germinación de semillas.
 - Cultivo de protocormos.
 - C.de ovulos fertilizados.

La multiplicación por medio de semillas puede ser posible si éstas se estratifican o escarifican y cultivándolas in vitro tardando en germinar de 90 hasta 300 días ya que la germinación en forma natural no se da o es muy bajo el porcentaje.

Para la germinación de semillas de Orquídea existen dos formas de estimular el proceso: 1) por medio de una simbiosis entre la semilla de las Orquídeas y un hongo y 2) la germinación de semillas en un medio asimbiótico en donde al medio de cultivo se le adicionan los elementos necesarios para lograr la germinación.

II.- OBJETIVOS

En el presente trabajo de investigación el objetivo es el de estimular el proceso de germinación de las semillas en un medio de cultivo asimbiótico planteándose los siguientes objetivos particulares:

- 1.- Evaluar el porcentaje de germinación en función de la concentración de regulador de crecimiento empleado (AIB, BA, y KINETINA).
- 2.- Analizar el desarrollo de las semillas en cada uno de los tratamientos.
- 3.- Establecer un método de desinfección efectivo para esta especie (*Catocotum sp.*).

III.- REVISION DE LITERATURA

3.1 IMPORTANCIA DE LA FAMILIA ORQUIDACEAE

Los bosques tropicales-húmedos del mundo son el lugar de origen y crecimiento de las Orquídeas, bosques que día con día son destruidos y devastados por la ambición de riqueza de algunos cuantos. A pesar de ello, actualmente hay en el mundo 25,000 especies originales y más de 60,000 híbridos

La Orquídea, flor exquisita, que junto con las gerberas aves del paraíso, los anthuriums y otras no menos apreciadas, fueron conocidas y apreciadas desde hace más de 2,000 años, allá en la Grecia antigua (Ames, citado por Zarate y Lee Espinoza , 1989).

Actualmente las Orquídeas son reproducidas predominantemente por cultivo de tejidos y división vegetal. La producción de 1987 a 1989 se estimó en 38 millones de plantas equivalente al 90 % del total de las Orquídeas reproducidas bajo ésta técnica.

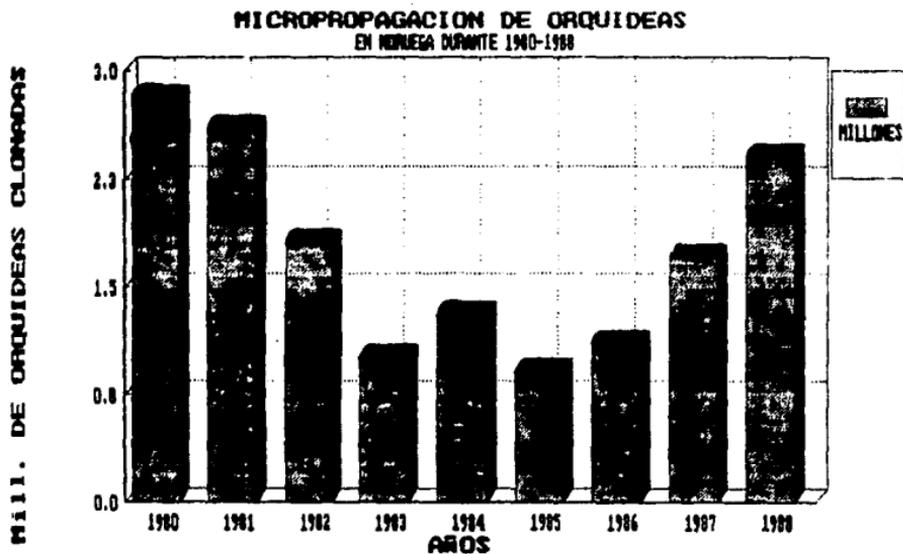
El 90% de la producción mencionada esta repartida entre las siguientes especies: *Oncidium*, *Vanda* (*Cataceum*), *Cattleya*, *Ascocenda*. (Zimmerman, 1990).

Las Orquídeas de zonas templadas esta dividida por los países de Tíwan, Korea, Japón, Singapur, Malasia, India; países que producen un total de 6 millones.

En México, las Orquídeas no se habían visto como una opción más de cultivo de flores de corte o de plantas para macetas, en la última década han surgido asociaciones y orquideólogos que se interesan por su propagación, así como por las técnicas de cultivo que lleven a su rápida obtención de ellas.

En la figura No. 1 se muestra la cantidad de orquídeas clonadas in vitro en Noruega durante el periodo de 1980 a 1988.

Figura No. 1



3.2 CARACTERISTICAS BOTANICAS

Las Orquídeas constituyen una importante familia de plantas monocotiledóneas que comprenden más de 800 géneros conformando así una de las familias más grandes del reino vegetal.

En general son plantas herbáceas, perennes, que pueden ser terrestres, epífitas, a veces lacustres, y también subterráneas; con rizomas o sin ellos o bien pseudobulbos. Los tallos pueden ser erguidos, trepadores o rastreros, pueden tener tallos tuberosos, y hojas de muy variadas formas.

Las Orquídeas se encuentran, con excepción de los polos, entre los 68° de latitud norte y los 56° latitud sur. Los países tropicales e intertropicales son los que poseen la mayor cantidad de especies de Orquídeas, algunas con cotas bajas y por lo tanto de estaciones sumamente cálidas, y otras en grandes altitudes de hasta 4,000 metros y por consiguiente de estaciones frías.

De lo anterior se puede decir que las Orquídeas no son de estación única, las diversidades climáticas de las variadas estaciones de las que provienen imponiendo otras condiciones creadas artificialmente para cada grupo de especies.

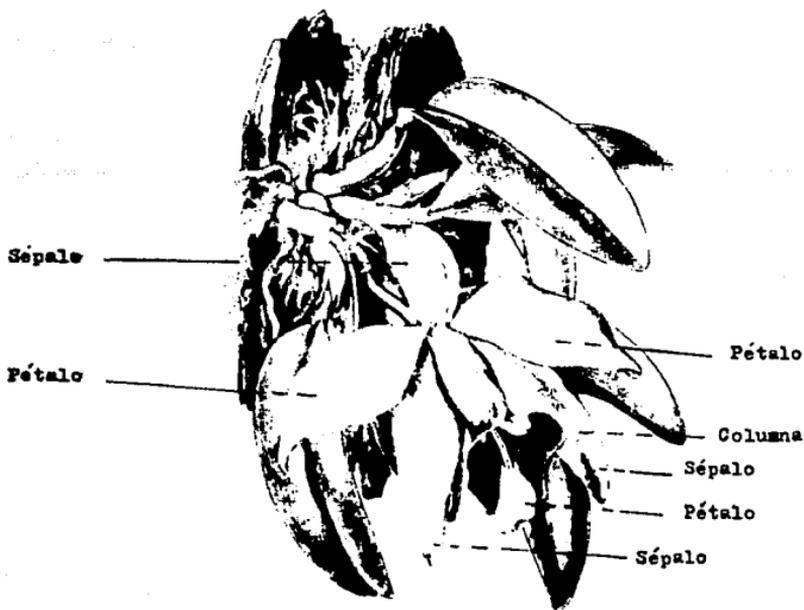
El secreto para cultivar Orquídeas es: Proporcionar un ambiente cuyas condiciones climáticas correspondan lo más exactamente posible a las de la región de la cual proceden. (Caneva, S., 1978).

3.2.1 FLORES

Según los ordenes botánicos que se tienen, la estructura de una flor de Orquídea, se puede comparar con una flor de otra monocotiledónia, por ejemplo el Tulipán. Los órganos sexuales se encuentran encerrados (en el Tulipán) por el perianto, el cual esta compuesto por tres sépalos externos y tres pétalos internos con estambres arreglados en dos espirales de tres y el ovario compuesto de tres lóculos.

En la flor de Orquídea la combinación arreglada es única, los tres sépalos son generalmente diferentes en su forma así como en el color de los mismos; los dos pétalos laterales son similares mientras que el tercero es diferente en tamaño, forma y color, así como en la ornamentación y es llamado labelo o labio. En *Cattleya* por ejemplo, el labelo difiere por ser conspicuo en muchas plantas, pero en algunos géneros es muy inconspicuo y más pequeño que los pétalos. En la figura número 2 se ilustra la estructura clásica de una flor de Orquídea.

FIGURA NO. 2, ESTRUCTURA CLASICA DE UNA FLOR DE ORQUIDEA.



De los seis estambres generalmente sólo uno es funcional, totalmente desarrollado y con estilos los cuales forman un órgano llamado columna; en lo alto de la columna se sitúa la antera y está separada por un lóbulo estéril, el rosetelo se encuentra debajo del estigma.

En la subfamilia Cypripediodiae, las flores muestran una variación en los dos sepalos laterales los cuales están unidos dentro de un órgano sencillo, llamado sínesealo y el dorsal es extra largo y conspicuo. Dentro de esta familia las tres anteras están cubiertas, una llamada estaminodio la cual está situada en el lugar del labelo y otro par que son fértiles y se encuentran a los de la columna.

La columna en la subfamilia Orchidoideae, en el 99% de las especies, es muy variada en forma, tamaño, color y ornamentación. La mayoría de las veces las Orquídeas son polinizadas por insectos y otro número considerable son polinizadas por murciélagos, caracoles y colibrís.

Una notable diferencia entre cada especie es el gran número de semillas producidas en las cápsulas. Para fertilizar una gran cantidad de óvulos para tener semillas, habrá de tenerse una buena transferencia de polen por el estigma. Este proceso se garantiza por el hecho de que los granos de polen no se separan o pulverizan como es usual en la mayoría de las especies, porque se forman agregados dentro de cera natural, bolas o polvos que se llaman polinias. Cada polinia está constituida por una gran cantidad de granos de polen unidos por sustancias viscosas y elásticas.

El proceso de polinización empieza porque el disco viscoso favorece que las anteras sean independientes para la visita de los insectos o pájaros a la flor por néctar, la polinia que va pegada a la cabeza, pico o espalda del insecto.

El polen de la primera flor se lleva por contacto al estigma de la próxima flor visitada adheriéndose a una sustancia pegajosa a la superficie del estigma; así se lleva a cabo el proceso de polinización.

Los insectos llegan hasta el lugar donde se encuentra el polen además de que muchos nectares son apetecibles al insecto, acompañándose frecuentemente por escencias y colores brillantes, por ejemplo, en muchas especies de *Oncidium*, se presenta un color amarillo intenso en el labelo el cual desempeña un papel importante para atraer al insecto; algunas flores son de por sí atractivas y no existe problema para perpetuar la especie; sin embargo, otras tienen que desarrollar complejos sistemas para asegurar la polinización.

En la apertura de la Orquídea, el óvulo crece considerablemente, y aunque los pétalos y sépalos empiezan a marchitarse lentamente esto sucede solamente después de la polinización.

La mayoría de las Orquídeas difieren en su periodo de maduración seminal. En el cuadro No. 1 se muestra el periodo de maduración seminal en algunas especies.

CUADRO NO. 1 PERIODO DE MADURACION SEMINAL EN ORQUIDEAS

Especie	Tiempo	Especie	Tiempo
<i>Catantbe</i>	04 meses	<i>Miltonia</i>	09 meses
<i>Cattleya</i>	11 meses	<i>Odontoglossum</i>	09 meses
<i>Cymbidium</i>	10 meses	<i>Paphiopedilum</i>	07 meses
<i>Cypripedium</i>	04 meses	<i>Phalaenopsis</i>	05 meses
<i>Dendrobium</i>	12 meses	<i>Pianhopez</i>	07 meses
<i>Epidendrum</i>	04 meses	<i>Vanda Calasetum</i>	20 meses

FUENTE: PIERIK, 1990

Las Orquídeas nativas de zonas templadas tienen un periodo más corto para que sus semillas y cápsulas maduren, dado que por efectos del clima las semillas tienen periodos de frios los cuales son causa principal para dicha maduración. Este hecho puede ser interesante a pesar de la extraordinaria variación en sus flores y su relativa similitud de cápsulas y semillas. Estas semillas son triloculares, globosas, ahusadas, además son longitudinales y acanaladas.

Las cápsulas en apariencia son inicialmente verdes, posteriormente toman una coloración amarillenta y finalmente café oscuro, cuando abren aparecen 3 ó 6 hendiduras longitudinalmente. Estas permanecen parcialmente conectadas por fibras y las semillas son, frecuentemente, dispersadas lentamente, esto sucede después de varios días de haber abierto la cápsula. Dentro de una cápsula se llevan a cabo reacciones higroscópicas dependiendo de la humedad relativa, lo cual regula la dispersión de las semillas.

Se afirma que las semillas de las Orquídeas son las más pequeñas del reino vegetal, pero esto se compensa con la gran cantidad producida en cada cápsula. (Cuadro No. 2).

CUADRO No. 2 CANTIDAD DE SEMILLAS EN CAPSULAS DE DIFERENTES ORQUIDEAS

Especie	Cantidad de semillas por cápsula.
<i>Dactylocteniza maculata</i>	6,200 semillas.
<i>Cymbidium</i>	1,500,000 semillas.
<i>Maxilaria sp</i>	1,700,000 semillas.
<i>Cattleya sp</i>	5,000,000 semillas.
DARVIN REPORTA LOS SIGUIENTES NUMEROS DE SEMILLAS CONTENIDOS EN DIFERENTES CAPSULAS DE ORQUIDEA.	
<i>Orchis maculata</i>	6,200 semillas.
<i>Cephalanthera grandiflora</i>	6,020 semillas.
<i>Scoperea sp</i>	371,250 semillas.
<i>Maxilaria sp</i>	1,756,440 semillas.
<i>Synoches chlorochilon</i>	3,770,000 semillas

FUENTE: Rittershausen B. and W., 1979.
Withner Carl, 1959.

En 1909 Kew Bulletin y Ricker (en Wickhma's orchids) citan y estiman un rango de 14 - 54 mil semillas para *Cynripedium*, número que ha sido comprobado.

Knudson (1956) y Hager (en Am Orchid Soc; 1952) citan que *Cattleya curantliaca* produce 929,000 semillas viables con un total de 2 - 3 millones.

Las semillas de Orquídea no tienen reservas alimenticias, lo único que tienen al rededor del embrión es una cubierta

transparente y en consecuencia éstas son sumamente ligeras, cada una pesa unos cuantos miligramos, esto hace posible que utilicen el aire como agente dispersante y así incrementar el porcentaje de germinación en forma natural.

La germinación en forma natural tiene que ver directamente con el peso de la semilla y del agente dispersante, cuando la cápsula abre, las semillas salen y debido a los agentes dispersantes recorren distancias considerables. Cuando las semillas germinan en forma natural es que están en una relación simbiótica con un hongo y la hifa está presente en el suelo o sustrato. Noel Bernard en 1904 descubrió esta simbiosis y publicó que durante la etapa de la germinación el hongo suministra los elementos necesarios al embrión para su crecimiento y posteriormente esta relación cesa y la hifa permanece de por vida dentro de la planta.

3.2.2 PARTES VEGETATIVAS

Dentro de la familia de las Orquídeas hay dos formas básicas en la planta las cuales se presentan a continuación:

A.- Monopódicas: Los tallos son jóvenes crecen en una sola dirección generalmente vertical, sin producción de brazos laterales.

B.- Simpódicas: En donde los tallos crecen generalmente en forma horizontal, desarrollándose brazos laterales a intervalos, cada brazo lateral desarrolla ramificaciones del mismo tipo.

El crecimiento monopódico se da en los géneros tales como: *Vanda* (*Catasetum* sp.), *Phalaenopsis*, *Aerides*, *Angraecum*, pero los tallos varían considerablemente en altura. El crecimiento Simpódico se encuentra en especies tales como: *Coclogyne*, *Dendrobium*, *Oncidium* y *Miltonia*.

En muchas especies simpódicas el tallo varía de una forma bulbosa llamado pseudobulbo; las hojas en muchas Orquídeas de ambos grupos son gruesas y en otras son carnosas y casi siempre

son de color verde oscuro. Una de las funciones de los pseudobulbos y de las hojas es almacenar agua y nutrientes durante los períodos en que no son productivas.

Las inflorescencias de las Orquídeas monopódicas son siempre laterales pero las de las Orquídeas simpódicas pueden tener ambos tipos de inflorescencias (laterales y terminales en espiga).

3.2.3 LAS RAICES

Una de sus funciones es proporcionar agua y alimentos, las raíces de las Orquídeas epifitas tienen como función principal la de anclar a la planta al tallo del árbol. Estas raíces pueden adherirse a la corteza del tallo de los árboles ó en algunos casos simplemente estar suspendidas en el aire.

Aunque generalmente sean cilíndricas, las raíces aéreas pueden ser en forma de hilos o trenzas delgadas como por ejemplo, *Phalaenopsis* . Pueden tener clorofila y de esta forma asimilar nutrientes para la fotosíntesis o, en casos extremos, como en *Microslia* y *Taenophyllum* , las plantas pueden tener hojas en todo el periodo de floración para transportar alimentos a las raíces. En algunas Orquídeas la fotosíntesis se lleva a cabo también en la flor dado que ésta es de color verde. Generalmente las raíces de las epifitas están rodeadas de capas de células muertas formando el velámen, el cual es capaz de absorber humedad del aire y así aislar a las raíces de las temperaturas excesivas.

3.2.4 CARACTERISTICAS GENERALES DE *Cataseium* sp.

Esta especie fue nombrada y descrita por L. Richard en 1822. Se encuentra en una franja geográfica que va desde México hasta el sur de América con una probable concentración en Brasil.

Las plantas crecen bien en musgo esfagnineo empacado y cubriendo la base de la planta, también pueden obtenerse buenos resultados en el crecimiento cuando se emplea estiércol bovino . Estas

plantas pueden crecer bajo condiciones similares o parecidas a las de *Calceya* y mantenerse un buen tiempo sin suministro de agua.

Las flores de *Calasetum* deben colectarse desde la base de la inflorescencia cuando son en racimos, esto se debe al alto contenido de agua en las plantas de Orquídea.

Calasetum sp, son epifitas de lugares tropicales-húmedos, se pueden encontrar en altitudes de hasta 1,800 msnm. En México se pueden localizar en los estados de Campeche, Chiapas, San Luis Potosí, Veracruz. También se encuentra en Belice, el Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua.

La producción de sus flores se ve afectada por la intensidad lumínica, las altas intensidades producen un mayor número de flores femeninas. Los pseudobulbos son de hasta 16 cm, los tallos de 6 cm de diámetro y cada uno está cubierto desde la base por más de 10 hojas caducas las cuales pueden tener longitudes de hasta 65 cm de largo y 9 cm de ancho. Las flores con tallo se originan desde la base del pseudobulbo cultivándose hasta los 40 cm, incluyendo la inflorescencia con 3 a 10 flores.

Las flores masculinas se reconocen por la capa o cubierta cónica del labio con el tubo pequeño casi abierto, la columna erecta, siendo la estructura que tienen las polinias que son fácilmente expulsadas cuando los polinizadores entran en acción.

El labio carnoso de la flor femenina está cubierto y tiene un labio largo y abierto con una columna corta y rechoncha.

La floración de *Calasetum* se da a partir de Julio hasta Octubre. *Calasetum* sp. con 57 especies.

(Caneva S., 1978).

3.2.5 CLASIFICACION TAXONOMICA

Reino	Vegetal
División	Spermatophyta
Subdivisión	Angiospermae
Clase	Monocotyledonae
Orden	Microspermae
Familia	Orchidaceae
Subfamilia	Orchidoideae (Neottioideae)
Tribu	Vandae
Subtribu	Catasetinae
Género	Catasetum
Especie	Sp. .

FUENTE: Thomas and Marion Sheenan.
in *Orchid Genera Illustrated*.
1979.

3.3 PROPAGACION in vitro

Características generales del cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos vegetales tiene sus orígenes tal vez desde que Hook en 1665 y Leewenhoek 1634 describieron a la célula y la actividad fisiológica de la misma, sin embargo los primeros trabajos bajo esta técnica se remontan a más de 120 años en donde las investigaciones de fisiología vegetal y celular utilizaban como partes vegetativas vivas a tejidos, órganos y células vegetales, además de cultivarse en medios nutritivos con una asepsia máxima, empleando también ápices de raíz, tallo y hoja, segmentos de tallo y algunas veces semillas, ovarios, anteras, polen, células aisladas y protoplastos. (FAO, UNESCO, 1985; PIERIK, 1990).

Los beneficios comerciales de la práctica y aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales para la propagación de plantas, tiene un gran impacto en las especies herbáceas principalmente (Cheng, 1978; citado por Cruz, 1983).

El cultivo de tejidos vegetales se basa en la llamada teoría de la totipotencia celular la cual fue descrita por Schwann y Schleiden (Citado por Gautheret y FAO, UNESCO, 1985). Las investigaciones se realizaron apoyándose en dicha teoría las cuales fueron suficientes como para que el cultivo de tejidos vegetales se expandiera rápidamente a muchos países desde 1964, pasando el número de investigadores en ese entonces, de 10 a 94.

Durante un congreso en Tenerife en 1985, diferentes investigadores franceses coincidieron que las especies trabajadas mediante la técnica de cultivo de tejidos en 1985 fue en orden de importancia como sigue:

Plantas de maceta.

Flores cortadas.

Bulbos y cormos.

ORQUIDEAS.

Ornamentales.
Cultivos agrícolas diversos.
Hortalizas.

Zimmerman en 1990 menciona que durante el año de 1988 las especies multiplicadas empleando la técnica de cultivo de tejidos en el Oeste de Europa, por orden de importancia es como a continuación se enlista el cuadro No. 3.

CUADRO No. 3 ESPECIES MULTIPLICADAS

Plantas de maceta.
Flores para ser cortadas (orquídeas).
Arboles frutales.
Bulbos y cormos de plantas ornamentales.
Pequeños frutos.
Plantas perennes de jardín.
Miscelanea de ornamentales.
Vegetales diversos.
Otros.

3.3.1 FASES O ESTADOS DEL CULTIVO DE TEJIDOS

Murashige (1974), menciona que en la propagación in vitro se llevan a cabo secuencias o fases especiales, dichas fases o secuencias son:

- 1.- Establecimiento del cultivo en un medio aséptico.
- 2.- Enraizamiento del propágulo o proliferación.
- 3.- Enraizamiento y preparación para el trasplante al suelo.

Villegas (1991) caracteriza 4 fases, 3 in vitro y una ex vitro. Sin embargo Zimmerman en 1990 establece 4 fases pero incluye la denominada fase "cero", en donde la planta madre o donadora del explanto, se encuentra en precondicionamiento, dichas fases se describen a continuación:

FASE " 0 ", ó PREACONDICIONAMIENTO

Esta fase se debe mencionar ya que la finalidad es prevenir problemas de contaminación por hongos y bacterias, considerándose los siguientes aspectos:

- a) Crecimiento y desarrollo de la planta en invernadero teniendo cuidado en lo que se refiere a temperatura y humedad.
- b) Cambios fisiológicos asociados a la planta madre; en el estado " 0 " incluye también algunas manipulaciones, de tal manera que la planta madre tenga mejores condiciones para el desarrollo in vitro, una de ellas es la luminosidad, temperatura, pretratamiento con reguladores de crecimiento. (Zimmerman, 1990).

FASE 1 ó ESTABLECIMIENTO ASEPTICO.

La finalidad de esta fase es evitar la contaminación del material vegetal, por lo que debe llevarse a cabo una cuidadosa desinfección del material.

En principio existen cuatro fuentes de infección: La planta, su interior y exterior; el medio de cultivo, el cual puede estar

insuficientemente esterilizado; el aire y la nula o poca destreza del investigador (Pierik, 1990).

Algunos investigadores han indicado que las semillas de Orquídea pueden germinar antes de que la cápsula esté madura (adquiriendo el color marrón ó cafe) y se abra. Esta información es importante, tanto para el aficionado, como para el profesional (Valmayor y Sagawa, citados por Pierik en 1990) ya que:

- 1.- Es mucho más fácil desinfectar una cápsula cerrada, que cada semilla individualmente, una vez que haya salido esta.
- 2.- La propagación precoz, a partir de la cápsula todavía verde, desgasta menos a la planta.
- 3.- Existe un menor riesgo de aborto embrionario con cruces entre especies y cultivares que nos esten estrechamente relacionados.

Pierik (1990), menciona que para esterilizar o desinfectar cápsulas cerradas, se baña a ésta con alcohol al 96% y posteriormente se flamea. La cápsula que contiene las semillas que generalmente está estéril en su interior, se abre después con un bisturí estéril.

Pierik (1990), dice que la esterilización de cápsulas abiertas o de semillas individualmente, constituye un proceso más delicado y complejo. Se colocan las semillas en un pequeño matraz (que posteriormente se tapa con un tapon de goma), conteniendo 10 % de NaClO a una concentración de 2-5 %, también se añade Tween 20 u 80. Las semillas viables generalmente se hunden mientras que las que flotan no contienen embrión. Después de la esterilización , el líquido es retirado y las semillas son lavadas con agua esterilizada.

Parra (1987), desinfectó frutos de vainilla los cuales contenían semillas, tan solo sumergiendolos en alcohol al 70 % durante un minuto. Se escurrió la lejía y se enjuagaron tres veces ó cuatro con abundante agua bidestilada esterilizada.

La efectividad de los agentes desinfectantes puede ser mejorada al adicionarles pequeñas cantidades de detergente. El detergente rompe la tensión superficial del agua y permite que el agente penetre y elimine los microorganismos. (Villegas, FAO; 1985).

Skirvin (1983), menciona que el método usual para la desinfección del tejido es usar concentraciones de hipoclorito de sodio en cantidades que substituyen al que normalmente da buenos resultados que usualmente es blanqueador comercial. El uso cuidadoso del blanqueador no produce daños.

Margara (1988), dice que la desinfección del material contaminado por bacterias del suelo es siempre difícil y aleatoria. Es mejor operar en condiciones ascépticas o limitar las condiciones siempre que ello sea posible.

Robbins (1922, citado por Margara, 1988) propone un método para las semillas aplicado por Gauthoret en 1942 en el cultivo de tejidos, que consiste en sumergir los explantos durante algunos instantes en alcohol y después en una solución de hipoclorito de calcio, enjuagandolos varias veces con agua estéril.

FASE 2 ó MULTIPLICACION DEL PROPAGULO.

En esta fase se busca un rápido desarrollo de los órganos y estructuras; este incremento puede ser debido a la inducción de brotes adventicios o brotes axilares, generalmente dentro del medio de cultivo se encuentran soluciones que ayudan al incremento de los brotes, estas soluciones suelen ser citocininas,

en presencia de una menor concentración de auxinas, buscando nivel hormonal más apropiado para cada caso. (Cruz, 1983; Zimmerman, 1991). En esta fase habrá de tenerse mucha atención en la concentración empleada de los reguladores de crecimiento.

FASE 3 ó ENRAIZAMIENTO

En esta fase se involucra la inducción y diferenciación de raíz en las partes vegetativas obtenidas durante la proliferación, existiendo así una conversión de un estado heterotrófico a un autotrófico al desarrollar esta raíces, en los protocormos de Orquídeas no existe una etapa bien diferenciada en donde aparezcan raíces definitivas sin antes haber aparecido rizoides.

FASE 4 ó ACLIMATACION

Una planta que se ha originado in vitro difiere en varios aspectos de las que se originan in vivo y estos pueden ser:

- a) Las plantas cultivadas in vitro tienen la cutícula (capa de cera) escasamente desarrollada, debido a la alta humedad relativa, 90 al 100% en consecuencia, cuando se transfiere al suelo se produce una transpiración cuticular extra ya que el aire es más seco.
- b) Las hojas de la planta cultivada in vitro son blandas, y fotosintéticamente poco activas y en consecuencia mal adaptadas a las condiciones de pueden encontrar in vivo.
- c) Las hojas presentan las células empalizadas con grandes espacios intercelulares y baja frecuencia de estomas y poco operativos, esto hace que dichas plantas sean más sensibles a la pérdida de agua.
- d) Las raíces que se han originado in vitro son vulnerables y no funcionan bien; presentan pelos radiculares escasos o nulos; por lo que mueren rápidamente y deben ser sustituidos por nuevas raíces subterráneas (Rowell y Villalobos; Pierik, 1990).

La aclimatación se inicia con un preacondicionamiento, disminuyendo la humedad relativa y controlando la temperatura y la luz (intensidad luminosa).

Para transplantar los individuos obtenidos in vitro se deben seguir los siguientes pasos:

- 1) El agar debe ser perfectamente eliminado de las plantas para evitar infecciones por hongos y bacterias.
- 2) Sumergir el sistema radicular in vitro en una solución fúngica e impregnar en un enraizador comercial para facilitar la formación de raíces verdaderas.
- 3) Transferir la base radical completa al sustrato que debe estar esterilizado y presentar las siguientes características:
 - Porosidad.
 - Drenaje suficiente.
 - Aereación.
 - pH adecuado para planta.

En los últimos años se han empleado los sistemas de nebulización para llevar a cabo la aclimatación de las plantas obtenidas in vitro.

En la propagación in vitro de Orquídeas se han publicado a menudo procedimientos en donde no se hace distinción entre las fases o etapas anteriormente mencionadas, sin embargo, es muy probable que el proceso de germinación pueda mejorarse con el empleo de estas fases mencionadas (Murashige, 1954; citado por Morales; 1990).

3.3.2 VENTAJAS DEL CULTIVO DE TEJIDOS

- 1.- Actualmente un objetivo importante, es obtener plantas conforme al tipo inicial
- 2.- Obtener plantas libres de patógenos y enfermedades virales.

3.- Lograr una grán poblaci3n de individuos y regulando su crecimiento.

4.- Obtenci3n rápida y masiva de plantas.

5.- Rescate de embriones inmaduros y promoviendo su crecimiento in vitro con el fin de obtener una planta madre.

(1) Morel y Martín; citados por Margara, 1988.

(2,3,4) Cheng, 1978; citados por Cruz, 1983.

(5) Maheswary y Raghavan, 1956, citados por Pierik, 1990.

Murashige (1978) menciona tres categorías generales del cultivo de tejidos vegetales relacionados a actividades agrícolas mismas que se presentan a continuación:

a)Es importante en los programas de mejoramiento genético por que acelera la disponibilidad de nuevas variedades.

b)Es útil en la conservación de germoplasma.

c)Se utiliza en la obtenci3n de plantas libres de enfermedades.

d)Permite incrementar notablemente el rango de multiplicaci3n de cultivares.

3.4 CULTIVO DE EMBRIONES

3.4.1 FENOLOGIA DE FERTILIZACION EN ORQUIDEAS

Uno de los eventos más importantes en el ciclo de vida de las plantas con flores es la fertilización, la cual involucra la fusión de dos gametos de sexos diferentes, obteniendo como resultado la formación de un cigoto. De este cigoto, que es una célula simple, se formará una entidad multicelular y multiorgánica para formar un organismo.

Con la germinación del grano de polen se incician muchos cambios en el pistilo; por ejemplo, se incrementa la respiración; cambian los patrones en la síntesis de proteínas y ARN; se incrementa marcadamente la actividad de diferentes enzimas; existen señales eléctricas en la base del estilo que indican si la polinización es compatible o no.

El desarrollo del embrión en la familia de las Orquídeas es un tema complejo y un cuanto confuso. Una razón para este gran número de variaciones es la pequeña cantidad de especies estudiadas.

Las variaciones que existen entre cada especie hace todavía más difícil el estudio del cultivo de embriones en las Orquídeas.

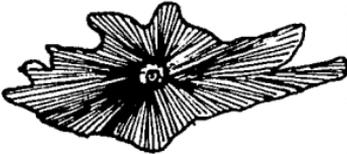
Estudios recientes indican que el embrión es una masa de células parecidas a una celda, sin áreas de diferenciación que aparecen después de la germinación y éstas áreas no han sido estudiadas aún. Las áreas de diferenciación en la familia de las parásitas y saprófitas tampoco ha sido estudiada, especies pertenecientes a los géneros de Balanophoraceae, Rafflesiaceae, Gentianaceae, Pyrolaceae, Orobanchaceae y la Burmanniaceae (P. Maheshwari; 1950).

La forma indiferenciada del embrión de las Orquídeas es uno de los factores que adiciona dificultad en la organización y clasificación de los embriones. Otra dificultad es debido al hecho de que la taxa ha sido poco estudiada.

EN LA FIGURA No. 3 SE ILUSTRAN ALGUNAS FORMAS DE LAS SEMILLAS DE ORQUIDEAS Y DE LA DEL EMBRION EN ESTA FAMILIA.

Fig. 3 crecimiento de la semilla en las Orquideas y algunas formas de semillas de Orquideas.

CIGOTO	1a. DIV	2a DIV.	EST. INTER.	ADULTO
				

VANDA (Catasetum) 	EPIPOGUM NUTANS 	G. ALTISSIMA 
GALBOLA LINDLEYANA 	HAEMARIA DISCOLOR 	
ACANTHOPHILIUM SYLTENSE 	VAINILLA PLAN. 	

FUENTE: BURGEFF, 1936

Todo cultivo de tejidos empieza con un órgano o porción de órgano. El cultivo de tejidos tiene gran importancia ya que conserva las características del órgano en cuestión. (Maramorosch, Himuri; 1979).

Hanning (1904), realizó el primer cultivo de embriones con éxito y describió el suceso de cultivo de embriones en crucíferas tomando vainas inmaduras. Su experimento lo realizó extirpando los embriones de las semillas y poniéndolos a cultivar. (FAO, UNESCO, 1985; Perik, 1990).

White P. (1930), inició el cultivo aislado de embriones, quien desarrolló un medio en el que los embriones recién en el estadio de corazón crecían en medio relativamente simple, con nutrientes inorgánicos y con sacarosa, los estadios iniciales requerían de la adición de muchos otros factores suplementarios, tan poco definidos (y en ese tiempo indefinibles) como el extracto de levadura.

Hanning (1934) cultivó algunas especies logrando vencer los obstáculos que se tenían para la transformación de semillas híbridas de cultivos con especies que incluían al *Linum* (Leibach 1929) y *Prunus* (Turkey, 1934). En tal experimento se hacía distinción entre el tamaño de los embriones de las especies cultivadas, tenían algunas dificultades para seguir creciendo y abortaban in vivo, por lo tanto les faltaba tamaño y reservas para continuar su crecimiento, ello requería de un subcultivo en donde se emplearían semillas maduras y simplemente un balance entre las sales minerales, azúcar y vitaminas.

Withner (1943), indica que para el cultivo de óvulos de Orquídeas es necesario considerar el tiempo entre polinización y fertilización para que pueda continuar creciendo el embrión y obtener plántulas in vitro. Withner menciona que la fertilización ocurre en tiempos diferentes; por ejemplo; en *Cauleya labata*.

se requiere de 75-90 días, en *Dendrobium nobile* es de 130 días, en *Phalaenopsis* se requieren de 63-70 días, en *Phalaenopsis villosum* es de 14 semanas.

Withner (1943) desarrolló una técnica la cual aportó algunas respuestas, especialmente concernientes a la dormancia y a los factores necesarios para el crecimiento del embrión de las Orquídeas. Esta dormancia no se considera en las semillas de Orquídea si se proporciona un medio de cultivo simbiótico, además de que se busca quitar los inhibidores, plantándose rápidamente, considerar las soluciones madres empleadas, pH y condiciones físicas.

Randolph y Cox (1945), aislaron embriones de *Phis* para acortar el ciclo de mejora, cultivaron embriones de diferentes cultivares de col para acelerar la germinación de las semillas. A partir de ese año el cultivo de embriones ha sido cada vez más empleado, sobre todo por los mejoradores vegetales en programas de mejora interespecíficos.

Withner (1953), de acuerdo a las respuestas obtenidas en su experimento de 1943, señala que fué posible hacer germinar semillas de *Cypripedium*. Esto fué posible obteniendo plántulas de *C. acule*, repetidamente por cultivo de ovúlos con 60 días de maduración. En contraste con esto, se fueron obteniendo plántulas de semillas recién maduras, puestas sobre un medio de iguales características, teniéndose pobre sobrevivencia de plántulas en dicho experimento.

Burgeff (1954) también consideró el problema de los inhibidores, especialmente en semillas nativas de Orquídeas europeas y de *Paphiopedilum*, y él recomienda colocar las semillas en un medio líquido por un tiempo o en agua destilada. (Burgeff 1954).

Withner (1955) cultivó ovúlos de *V. planifolia* de 15, 30, 45, 75, 180 y 220 días después de la polinización y obtiene germinación en ovúlos de 30, 45 y 75 días, concluye que a los 15 días aún no había transcurrido la fertilización y por lo tanto, no germinaron y que las semillas de 180 y 220 días de edad presentaban cubierta seminal lignificada y gruesa que impidió la germinación.

Sagawa (1967; citado por Parra, 1987), menciona que el tiempo entre polinización y maduración del fruto en Orquídeas es largo y el cultivo de óvulos es una alternativa para obtener plántulas en un corto plazo, sin embargo, dice que es necesario conocer el momento en que ocurre la fertilización para que el cigoto siga su crecimiento *in vitro*.

Bidwell (1979) menciona que la mejor fuente posible de nutrientes para el crecimiento embrionario es el endospermo y la adición de leche de coco al medio de cultivo, lo cual hizo posible el cultivo de embriones aislados en etapas muy tempranas de desarrollo.

Pierik (1990) hace una distinción a dos tipos de cultivo de embriones:

- 1.- CULTIVO DE EMBRIONES INMADUROS que se originan de semillas no acabadas de madurar. Este tipo de cultivo se emplea sobre todo para impedir el aborto embrionario (muerte prematura del embrión) con el fin de obtener una plántula viable. Este tipo de cultivo es extremadamente difícil; en parte porque se necesita una ardua disección, y también porque se necesita un medio de cultivo complejo. Las posibilidades de éxito de éste tipo de cultivo, dependen mucho del estado de desarrollo del embrión en el momento de ser aislado.

2.- CULTIVO DE EMBRIONES MADUROS que se encuentran en semillas maduras. Este cultivo es relativamente fácil, y se utiliza, por ejemplo, para eliminar la inhibición (absoluta) de germinación de las semillas. Suele ser suficiente en estos casos el uso de un medio simple con agar, azúcar y minerales.

Si se compara el desarrollo de embriones inmaduros in vitro in vivo si partimos del estado globoso, los embriones in vitro generalmente tienen :

- a) Un crecimiento globoso en forma de pera.
- b) Una expresión morfogénica retardada: Estado globular más largo.
- c) Inicialmente un sólo cotiledón (en dicotiledóneas) mientras que en in vivo se desarrollan los dos en forma simultánea.
- d) Posibilidad de exhibir un desarrollo policotiledonar (más de dos cotiledones), lo cual rara vez sucede in vivo.

Los embriones aislados in vitro generalmente muestran una germinación (Jensen, 1976, citado por Pierik, 1990) ya que se produce una pérdida de inhibidores al retirar la cubierta seminal, otra razón puede ser el potencial osmótico negativo que existe in vivo, pueda que sea mucho más alto in vitro.

3.5 REPRODUCCION DE ORQUIDEAS A PARTIR DE SEMILLAS

Bernard (1909; citado por Pierik, 1990), descubrió en forma accidental que los hongos juegan un papel muy importante en la germinación de las semillas de Orquídea. De hecho, las Orquídeas viven en una relación simbiótica con algunos hongos desde el momento de la germinación. La simbiosis es la asociación de dos organismos con ventajas mutuas. A las asociaciones simbióticas entre hongos y raíces se les llama micorriza.

Knudson (1922; citado por Pierik, 1990) demostró que era posible la germinación de las semillas de Orquídea sobre un medio simple el cual en su contenido integrara minerales y azúcares sin necesitar la presencia del hongo, ya que también este es de poca importancia en la fase juvenil de las plantas, pues las plantas son autótrofas (Withner, 1974). Las investigaciones desarrolladas por Knudson supusieron que las semillas de Cattleya, Laelia, Epidendrum y de otras muchas Orquídeas eran capaces de germinar asimbióticamente in vitro. A pesar de los descubrimientos de Knudson, pronto se pudo comprobar que no siempre es posible hacer un medio en el que una determinada especie de Orquídea pudiese germinar y desarrollarse sin problemas.

De acuerdo con Arditti (1967); Harley (1969) y Pierik et al (1982); citados por Pierik, 1990), la germinación de las semillas de Orquídea tiene lugar de la siguiente manera: El embrión absorbe agua a través de la testa aumentando de volumen . Después se inicia la división celular, rompiendo en este momento el embrión la cubierta seminal. A continuación se forma una estructura llamada protocormo, a partir del agregado de células y sobre éste se puede distinguir un meristemo del vástago en la parte superior, y por otro lado, los rizoides; a partir de este momento se inicia un período de crecimiento intenso. Si el protocormo está a la luz, adquiere un color verde y al mismo tiempo se desarrollan hojas

como resultado de la formación de clorofila, la planta se hace autótrofa. Mas tarde las primeras raíces auténticas se forman endógenamente; el protocormo y los rizoides (pelos radicales) pierden su misión nutritiva y desaparecen.

Lucke (1971; citado por Pierik, 1990) afirmó que las semillas de Orquídea no se pueden sembrar cuando éstas se encuentran en un estado intermedio entre la fertilización (que tiene lugar muy tarde en las Orquídeas) y la maduración de la cápsula. El mismo autor aconseja que se deben sembrar las semillas in vitro antes de que la cápsula haya llegado a sus dos terceras partes de madurez.

Hadley (1973; Harley, 1969; citados por Pierik, 1990), menciona que las semillas de Orquídea necesitan para llevar a cabo el proceso de germinación la asociación con un hongo, los hongos más importantes que tienen relación simbiótica con las Orquídeas pertenecen al género Rhizoctonia, la principal razón para pensar esto era porque las semillas son de tamaño muy pequeño y por lo tanto sus reservas serán muy pocas ó nulas.

Walter R. (1972) menciona que el crecimiento de las Orquídeas desde la semilla es un delicado y complejo proceso que muchos aficionados prefieren evitar, es quizá uno de los aspectos más complejos del cultivo de las Orquídeas. En otras familias de plantas el proceso de la germinación es un evento normal y en algunas ocasiones se le considera insignificante; pero en el caso de las semillas de Orquídea es una dedicada responsabilidad inevitable ambición de investigar y lograr resultados.

En la germinación se lleva a cabo una peculiar interdependencia entre las semillas y un hongo, cuando las semillas toman una coloración verde, el hongo se siembra en ese momento y da lugar a la relación de simbiosis. Generalmente para poner a germinar semillas se emplea el medio básico de Burgeff y Knudson.

Smith (1975, citado por Pierik, 1990) afirmó que la cubierta seminal no tiene efecto inhibitor sobre la germinación de las semillas de las Orquídeas.

Van der Kinderen (1982; citado por Pierik, 1990), indicó que la germinación de algunas Orquídeas estaba influida por la concentración de ABA de las semillas, de manera tal que si la concentración de ABA era alta, se producía una germinación pobre en la mayor parte de los casos.

Yung-ho (1986) cultivó secciones del tallo floral de *Phalaenopsis* y *Dorisaenopsis*, los cuales fueron cultivados en el medio modificado de Vacin y Went con BA al 1 ó 5 mg/L. Después de 30 días de cultivo, se observaron protocormos que se formaban sobre la epidermis y la superficie del corte.

Yung-ho (1987) realizó algunas observaciones histológicas de la formación de procormos florales a partir de entrenudos del tallo de *Phalaenopsis* en cultivo de tejidos, los cuales revelan que el número inicial de células con núcleo y protoplasma denso existente en la epidermis, cortex y haces vasculares inmaduros y estos divididos o capaces de dividirse en las etapas tempranas de los entrenudos. Dichas células empiezan a dividirse entre los 7 y los 11 días después de que los tallos son puestos en el medio de cultivo y cuando tienen tamaño de protocormo se hace un corte en la superficie en secciones, después de 20 ó 45 días de haberse iniciado la división celular.

Waes, J-Van (1987) realizó un estudio del efecto del carbón activado en 18 especies durante la germinación. Para todas las especies en prueba la adición de carbón activado (0.02 - 0.1 % p/v) al medio de cultivo, resultó que se tenía lenta germinación, así como un lento desarrollo vegetal. Especies con alta liberación

de polifenoles en el medio de cultivo (*Anacamptis pyramidalis*, *Dactylocteniza* sp , *Spicata* sp , *Gumnadenia* sp , y *Listeria ovalis*) mostraron marcadamente un mejor desarrollo al ser transplantadas al medio con carbón activado.

Sharma,-SK; Tandon, (1987), llevaron a cabo la germinación axénica de algunas Orquídeas epífitas de la India, En el experimento las semillas de *Cymbidium elegans*, *Coelogyne prolifera*, *C cristata*, *C proreeta*, *Serdes multiflorum* , *Bulbophyllum cosmosus* y *Thunia alba*, fueron puestas a germinar en tubos los cuales contenían medio de cultivo de Knudson C, Pfeffer modificado o Vacin y Went a 25^o C en la obscuridad por dos meses. Después de este lapso de tiempo se transfirieron a luz continua con 3000 lux. La mejor germinación en todas las especies se obtuvo en el medio de Knudson en un rango del 80 % en *S multiflorum* a 14 % en *C prolifera*. El tiempo requerido para el desarrollo de los protocormos se estableció dentro de un rango que va de las 10 a 15 semanas. El promedio de volumen se situó (0.36 mm³) en *C prolifera*. La etapa final de desarrollo del protocormo se presentó con la aparición de los inicios de raíz o rizoides lo cual sucedió entre la 10^a y la 12^a semana para la mayoría de las especies en estudio.

Katiyar, Sharma (1987) pusieron a germinar semillas y observaron el desarrollo de las plántulas de *Coelogyne punctulata* y *Serdes multiflorum*. Las dos especies son Orquídeas epífitas y un tanto raras las cuales se obtuvieron de los bosques tropicales de Meghalaya, India. Las semillas fueron cultivadas en el medio de Knudson C (suplementado con 100 g de pulpa de plátano y con un pH de 5.0) a 25 +/- 2^oC en la obscuridad, cuando llegaron a formar protocormos se pasaron a la luz continua con 1300 lux con 12 h/día. Las semillas germinaron a los 90 días, presentando un porcentaje de germinación del 81.4 % para *S multiflorum*. Los datos también revelaron que después de 6 meses de desarrollaron las

plántulas de *C. punctulata* y que fueron más vigorosas que las de *C. multiflorum*.

Das, Ghoshal (1989), estudiaron el comportamiento y la germinación de algunas semillas de Orquídeas del oeste de Bengala. La germinación in vitro de las semillas se produjo individualmente y por cruzamiento de diferentes especies que fueron estudiadas en el medio modificado de Knudson y Burgeff. De ambos medios, el de Burgeff fue el que ensanchó a las semillas aún estando descapsuladas las semillas de *Dendrobium*, *Chrysotoxon*, *D. crepidatum*, *Senecio multiflorum*, *Cymbidium aloifolium*, germinando sucesivamente. Ambos medios fueron buenos y estos fueron suplementados con ANA a una concentración de 1 mg/l.

Yan Tw (1989) empleó agentes como el carbón activado para lograr la germinación de las semillas de Orquídea, menciona que la práctica de incorporar o agregar al medio de cultivo carbón activado, para llevar a cabo la germinación de las semillas de Orquídea debería de ser ampliamente discutido y estudiado.

Paek y Shim (1989), realizaron una explotación de Cymbidiums, estableciéndolas en cultivo de tejidos, analizaron la germinación asimbiótica de *Cymbidium* de clima templado y observaron el efecto de un medio con reguladores sobre la organogénesis. El experimento se efectuó con 43 variedades de semillas obtenidas bajo libre polinización y polinización cruzada de 7 especies de *Cymbidium* las cuales mostraron variación en la maduración y el tiempo de germinación. El promedio de tiempo requerido para la maduración de las semillas fue de 307 días y el promedio de días a la germinación fue de 277 días. La longitud de las semillas estuvo dentro de un rango que se situó de los 1.0 a 1.7 mm y el ancho dentro de los 0.15 a - 0.25 mm. La mayor parte de las semillas germinaron sobre el medio de Knudson suplementado con un 10 % de agua de coco. A bajas concentraciones de ANA se obtiene buen crecimiento de rizoides y a altas concentraciones se obtiene buen crecimiento de protocormos los cuales originan renuevos.

3.6 DESARROLLO DEL EMBRION DURANTE LA GERMINACION

En las Orquídeas el embrión es casi siempre una masa ovoide de células en donde no se puede distinguir meristemo de raíz, tallo y cotiledón, de tal manera que la diferenciación de estas partes ocurre después de que la semilla ha roto la cubierta seminal. (Maheswari, 1950).

Parra (1987) cita a :

Raghavan y Torrey (1963) quienes cultivaron embriones in vitro de *Capsella bursa-pastoris* de diferentes edades; encontraron que embriones mayores de 80 μm (forma de corazón en los primeros estados) crecen fácilmente en el medio de cultivo y se diferencian normalmente en tallo, raíz y primordio de hojas alrededor de tres meses, pasando por las formas de: " corazón, torpedo, bastón, U invertida y embrión maduro. Por otro lado, al cultivar embriones en estado globular (< 80 μm) en el medio de cultivo básico, no muestran ningún signo de división y alargamiento celular, sin embargo al complementar este medio con ácido indol acético, Kinetina y sulfato de adenina, encontraron que estimula el proceso de división y alargamiento celular; pasando en algunos casos por los estados de embriogénesis antes señalados y en otros casos presentaron estructuras anormales no características de la especie.

Arisum (1980) emplea la técnica de cultivo de embriones y óvulos y obtuvo plantas de varias especies de *Smrallens* que son incompatibles en forma natural. El mismo autor indica que al sembrar embriones en estado globular se producen plántulas anormales o mueren en pocas semanas, sin embargo, al sembrarlos en un estado más avanzado de desarrollo (corazón) la sobrevivencia y obtención de plántulas aumenta. Al respecto, Raghavan (1966) y Srivastava (1982) indican que en general, se pueden reconocer dos fases en la nutrición del embrión en desarrollo:

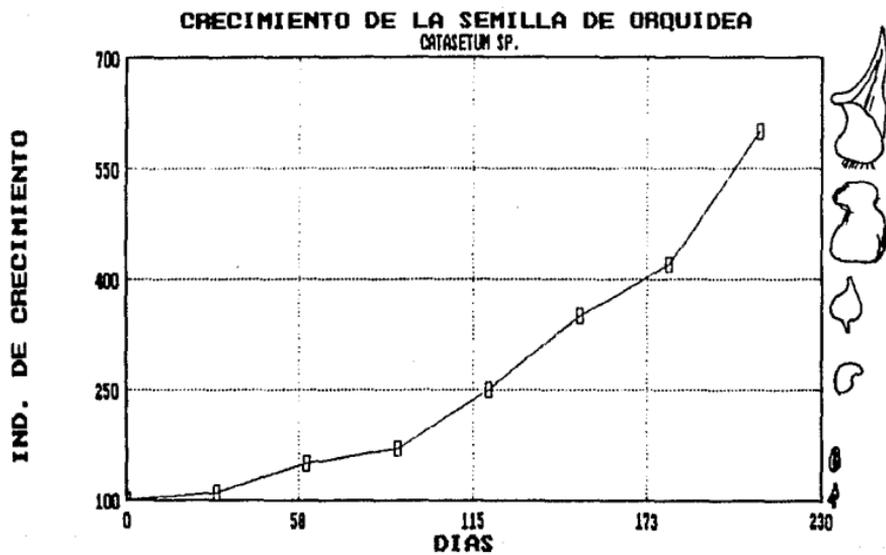
a) Una fase heterótrofa, en la cual el embrión depende de complejos factores nutricionales que se encuentran en el endospermo y

b) Una fase autótrofa en la cual el embrión es suficientemente independiente del endospermo que permite el cultivo in vitro en un medio complejo. El embrión en estado globular es heterótrofo, en estado de corazón, es autótrofo con el inicio del desarrollo de los cotiledones.

Monnier y Lagriffol (1986) compararon el crecimiento de embriones aislados y embrión en el óvulo in vitro contra el desarrollo del embrión en la planta de *Capsella*. La longitud inicial fue de 120 μm y la longitud alcanzada después de 6 días fue de 500 a 900 y más de 1,300 μm , para un embrión aislado, embrión en el óvulo y embrión en la planta, respectivamente. Por otro lado, encontraron que la diferenciación del embrión en las tres diferentes condiciones fue la misma; sólo que *in situ*, el embrión si alcanzó a formar cotiledones y en las otras dos condiciones no. Lo anterior puede deberse a que el óvulo unido a la planta posee todos los factores necesarios para inducirse a una diferenciación normal; no sucediendo así cultivado in vitro. Sin embargo, este resultado no esta de acuerdo con Monnier (1984) pues encontró un incremento en el estado de diferenciación del embrión al estar rodeado de tejido ovular en la misma especie (*Capsella bursapastoris*).

En la figura No. 4 se muestra el crecimiento observado en las semillas de *Calceolum* sp. El índice de crecimiento se colocó a partir de 100 (estado de semilla).

Figura No. 4 Crecimiento de la semilla de Orquídea
Catasetum sp.



3.7 FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA GERMINACION DE LAS SEMILLA

Se tiene información sobre experimentos que se han realizado acerca de los requerimientos y fisiología de las semillas durante la germinación bajo condiciones asimbióticas (i. e. artificial). De alguna manera los datos obtenidos de estos experimentos no son completamente representativos. Sin embargo, comparaciones entre experimentos asimbióticos y simbióticos sugieren apoyarse en los experimentos asimbióticos.

3.7.1 EFECTO Y UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS

Actualmente se sabe que un tejido cultivado *in vitro* puede perder gradualmente su pigmentación verde y tiene que depender de una fuente externa de carbono para sobrevivir; estos cambios se representan bajo condiciones especiales donde el tejido no es autótrofo en cuanto a elaborar su propia energía. Por otra parte, una estructura verde y bien organizada puede mostrar un mejor crecimiento y proliferación con la adición de una fuente de carbono en el medio y por lo tanto se considera esencial. La fuente de carbono más comúnmente utilizada es la sacarosa, las concentraciones varían de acuerdo a la especie, órgano, tejido o célula en estudio y va de 2 a 12% o más; se ha demostrado también que es mejor esterilizar la sacarosa mediante el autoclave que filtrándola, ya que durante este proceso puede sufrir hidrólisis y es más eficiente su utilización por el inóculo (Bhojwani y Razdan; 1983).

Los primeros estudios sobre la conveniencia de emplear azúcar como fuente de carbón para la germinación de semillas de Orquídea (Bernard 1909) fueron hechos ante la formulación del medio de cultivo asimbiótico. Comparaciones entre diferentes azúcares hicieron posible definir un medio de cultivo en donde fueran disponibles. Los resultados fueron publicados después de la primer investigación de Knudson (1916, 1921 et al); los carbohidratos se clasificaron como capaces e incapaces de influir en la

germinación. Algunas especies tienen la capacidad de germinar con diferentes azúcares, pero en algunas instancias las dificultades fisiológicas que se presentan son complejas y dan pauta para saber si la fuente de azúcar es la conveniente.

La lista de azúcares capaces e incapaces no es muy grande. Las Orquídeas no so la excepción de la regla de los organismos que generalmente degradan D-azúcares. La galactosa es tóxica para las Orquídeas así como para cultivo de tejidos, esta inhibe el crecimiento de las semillas de Orquídea y de otras plantas a concentraciones bajas de 0.9 mM o 0.0125% y puede afectar el metabolismo para la síntesis de celulosa o la actividad de la hexoquinasa o ambos.

Cuando se emplea galactosa, la cromatina celular aparece dispersada por todo el núcleo y concentrada alrededor de él, (Ernst et al, 1971). En algunas instancias el núcleo puede envolverse dentro del citoplasma, algunas veces incluye a ambas membranas o sólo una, lo que es más común; en consecuencia las membranas aparecen sin cromatina.

Por el tamaño de las moléculas de polisacáridos pueden tener problemas de permeabilidad en las Orquídeas como en otras plantas, y las enzimas hidrolíticas pueden ser extracelulares. La permeabilidad puede ser prevenida con la utilización de ácidos orgánicos. Esto es raro para las semillas de Orquídea ya que en la naturaleza necesitan de una infección con un hongo para la germinación, y la semillas con crecimiento normal sobre manitol, dos carbohidratos de origen fúngico. La theralosa que es transportada dentro de las semillas por las hifas de los hongos, que obtiene glucosa por la hidrólisis de la celulosa por la micorriza de la Orquídea (Hadley, 1968, 1969).

El inositol es un compuesto (algunas veces clasificado como vitamina o como factor de crecimiento), algunos otros autores los clasifican como un azúcar con alcohol por los bajos beneficios (Arditti y Harrison, 1977), pero es una fuente insustituible de carbón. La glucosa es muy común en las plantas y en los hongos

es un componente de los polisacáridos o de las moléculas libres y es punto de partida de muchas vías del metabolismo, por lo tanto las semillas de Orquídeas pueden utilizar la glucosa (Freson, 1969).

Diferentes reportes indican que el número de especies de Orquídeas que germinan y crecen sobre fructuosa y galactosa es grande (Ernst, 1967). Por ejemplo, *Phalaenopsis* utiliza fructuosa preferentemente a la glucosa. Por otro lado *Cattleya* no crece con la fructuosa, lo realiza mejor con sacarosa o glucosa.

Lo más común para la germinación de semillas de Orquídeas es emplear azúcar, lo que hay que cuidar mucho es la concentración. La proliferación de protocormos se aumenta por los niveles óptimos de sacarosa, también se incrementan las áreas de la organogénesis cuando las condiciones son las idóneas.

Por ejemplo, en un experimento con semillas de *Cattleya aurantiaca* sobre el medio de Knudson C con y sin sacarosa indican los siguiente:

Las semillas sobre KC sin sacarosa pasaron a estado de protocormo pero no produjeron raíces.

Las semillas sobre KC con sacarosa se desarrollaron normalmente.

Las semillas sobre KC con sacarosa se desarrollaron y sólo el 13 % produjo plántula y se transfirieron a medio sin sacarosa.

Después de 28-30 días los protocormos transferidos a KC sin sacarosa formaron hojas y desarrollaron grandes plántulas. De los protocormos transferidos, después de 47 días de KC a KC sin sacarosa, el 92% formaron plántulas completas. Estos datos indican que los carbohidratos no son necesarios para el crecimiento después de la aparición de la primer hoja.

En la figura número 5 se muestra la influencia de diferentes azúcares sobre las semillas de *Cattleya aurantiaca*.

En la figura número 6 se muestra el efecto de la esterilización por autoclave en semillas de Orquídeas y la esterilización por frío (*Cattleya aurantiaca*).

FIGURA No. 5

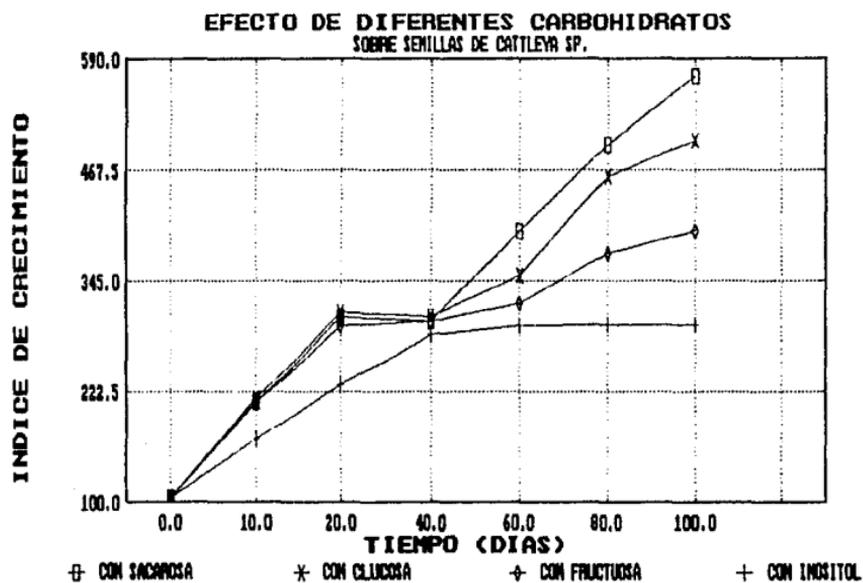
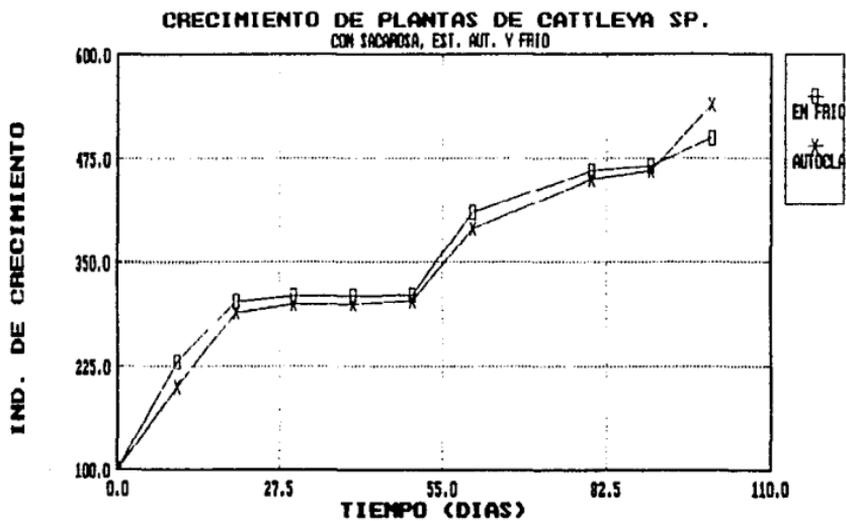


FIGURA NO. 6



3.7.2 FUENTES DE NITROGENO

El nitrato de amonio y la urea son convenientes como fuentes de nitrógeno para la mayoría de las especies de semillas de Orquídea. Algunas especies presentan mejor crecimiento con el amonio (Arditti, 1967, 1979). Otras especies al parecer son incapaces de utilizar los nitratos durante los primeros estadios de la germinación (Debergh, 1974).

Las semillas de *Tillandsia*, por ejemplo, pueden crecer sólo con el nitrato despues de los 60 días. Desarrollan su habilidad para utilizar el nitrato paralelamente a la aparición de la nitrato-reductasa. Estos datos sobre la germinación de las semillas dicen que éstas son bioquímica así como morfológicamente diferentes.

Los resultados obtenidos al emplear urea son contradictorios en nueve especies del mismo genero (Cappelletti, 1933) y estimuladas (Burgeff, 1936) por la urea, pero hubo un desarrollo en la Vainilla (Lugo-lugo, 1953), *Cattleya* y *Vandaeas* (*Catasetum*) fueron aumentadas en tamaño. Existen diferencias entre las especies en los requerimientos o respuestas a la urea, nitrato y amonio. Otra razón, para que los resultados sean variables, puede ser la diferencia en edad entre las plántulas y en ellas la presencia de la nitrato-reductasa. La insinuación del NH_4NO_3 como fuente de nitrógeno más apropiada y al parecer es razonable.

Casi todos los aminoácidos y algunas sustancias tienen que ver con las fuentes de nitrógeno aplicadas, por ejemplo, la Arginina, Ornitina y Urea. Los resultados que se pueden esperar con otros aminoácidos pueden ser variables, porque son mezclas complejas las cuales pueden cambiar durante el autoclaveado.

Rückev menciona (1973) que como fuente de nitrógeno no se puede asegurar un compuesto definitivo ya que en algunas especies se puede causar malformación desde los protocormos.

El nitrógeno influye en el índice de crecimiento de la planta, es un elemento esencial en la composición molecular de la clorofila, alcaloides, ácidos nucleicos, en algunas hormonas de

las plantas y aminoácidos.

La falta de N, es característico por el amarillamiento de las hojas e impide el crecimiento; el exceso de N promueve crecimientos vigorosos, pero suprime el desarrollo de los frutos. (Kyte, 1987).

2.7.3 NUTRICION MINERAL

La mayoría de los medios de cultivo emplean para la germinación de semillas de Orquídea y cultivo de éstas, soluciones concentradas para nutrir a las semillas de las epífita. Los embriones de las epífitas generalmente germinan bien en soluciones concentradas. Los iones pueden tener diferentes efectos según su concentración. Los aniones juegan un papel muy importante en la germinación de las semillas de Orquídea. Un trabajo reciente con *Cordia* determinó el rango óptimo de iones para la formulación del medio de cultivo.

Al parecer, la concentración es un factor importante para la germinación. Sin embargo, no se puede generalizar esto ya que la información es limitada (Ichhashi, 1978). Anteriormente al desarrollo de los agentes quelatantes, la precipitación de los metales fue un gran problema para la germinación de las semillas de Orquídea y algunas sustancias fueron empleadas para asegurar su disponibilidad.

Comparando algunas investigaciones, se sugiere disminuir los niveles de fósforo para incrementar la germinación. Una posible razón es que las semillas de Orquídeas son sensibles a este elemento.

Y otra es que a niveles elevados de fósforo puede llevar a la deficiencia de metales, así como a un resultado de formación de complejos insolubles durante la esterilización. Protocormos de *Symbidium* sobre un medio de cultivo sin fósforo se tornaron amarillo-verdosos y se cubrieron con puntos negros, pero no murieron si no hasta los 100 días de haber permanecido en este medio de cultivo. (Debergh, 1974).

El fósforo aparece con su principal actividad al activar las enzimas (las enzimas, son compuestos que promueven reacciones sin ser parte de ellas). Muy poco fósforo puede causar plantas anormales y enfermas; las fuentes de fosforo empleadas in vitro son el fosfato de potasio ($K_2H_2PO_4$) y el fosfato de sodio ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) (Kyte, 1987) se requiere de 1-5 mmol/l (Pierik,1990)

Calcio

Algunas especies germinaron muy bien sobre un medio de cultivo bajo en calcio, especialmente especies terrestres. Quitando el calcio al medio de cultivo no tiene efectos perjudiciales, por lo tanto, los requerimientos de calcio deben ser bajos. El calcio es aprovechable como pectato de calcio, es una parte integral de la pared celular de la planta, y juega un papel en la permeabilidad de la misma pared. Facilita el movimiento de los carbohidratos y aminoácidos por toda la planta y promueve el desarrollo de la raíz. Como oxalato de calcio esta vinculado al ácido oxálico por producto del metabolismo celular. El calcio es incluido usualmente en el medio de cultivo como cloruro de calcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) o como nitrato de calcio ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$). En el medio de cultivo se aplica de 1.5 mmol/l (Kyte, 1987; Pierik,1990)

Magnesio

Es el elemento central de las moléculas de clorofila , es importante también como activador de enzimas. La deficiencia de magnesio causa palidez y enfermedades en el follaje. En la fórmula de los medios se suministra como sulfato de magnesio ($SO_4 \cdot Mg \cdot 7H_2O$), también conocidas como sales epsom. (Kyte, 1987). Su requerimiento en el medio es de 1-5 mmol/l. Pierik,1990).

Azufre

Esta presente en algunas proteínas, promueve el desarrollo de raíces y de un follaje verde. Es suministrado en el medio de

cultivo en forma de sulfatos (SO₄). (Kyte,1987).

Los microelementos no se incluyen siempre para la germinación de semillas en el medio de cultivo porque las cantidades suficientes se presentan o aportan en el azúcar, agar o sales; es importante tomar en cuenta la pureza de los elementos anteriores para considerar la adición de los microelementos. Algunos casos reportan la adición de Cobalto, Boro, Iodo, Manganeso, Molibdeno, ello porque se considera que las semillas no tienen lo suficiente.

3.7.4 LIPIDOS

Algunas células de los embriones de *Callieya* contienen reservas nutricionales de lípidos. La consistencia de los cristales de proteínas al rededor de las membranas no degenera a las células de *Gymnidium* y posteriormente a los protocormos. Excepto para algunos granos de protoplastidos, almidones u otros carbohidratos, las reservas no se encuentran en estas semillas. Estas investigaciones confirman que la mayor parte de las reservas de las semillas de Orquídeas son lípidos.

Algunos análisis indican que las semillas contienen (escasas o nulas reservas) 32% de lípidos (Knudson, 1929) . De la misma manera existe una cantidad similar de reservas de compuestos que se localizan en el endospermo y/o en los cotiledones de las plantas.

La ruptura o desdoblamiento de los lípidos se asocia con el tejido adiposo de las semillas lo cual se asocia con el glioxisoma, y esto no es fácil de detectar durante la germinación.

Las semillas de *Callieya* convierten sólo el 3 % o menos de acetato ²¹⁴ dentro de los azúcares (en contraste con el 90% de la conversión de las unidades de acetil). Evidencias disponibles indican que la Acetil CoA genera cuerpos liposos los cuales pueden estar en el ciclo de Krebs en la mitocondria, en donde son oxidados a dióxido de carbono con la liberación de energía. Estas evidencias pueden, de alguna manera, reflejar la ausencia en las Orquídeas de cotiledones o endospermo, que son órganos capaces de convertir el acetato en azúcares.

3.7.5 FOTOSINTESIS

La clorofila fue detectada en semillas de *Callitrypa aurantiaca* sobre el medio de Knudson C (Knudson, 1946) 15 días después de haberse sembrado. Los niveles de clorofila a (Ch a) y b (Ch b) son casi iguales comparándolas con respecto al tiempo de permanencia de 1 a 1½ meses (Harrison, 1973, 1977; Harrison y Arditti, 1978) pero con el tiempo los niveles de Ch a se incrementaron hasta su máximo (a los 180 días), las concentraciones de clorofila b permanecieron sin cambiar. En la ausencia de sacarosa, la clorofila a y b permanecen constantes.

La actividad de la ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa (RuBP) es un componente importante del aparato fotosintético, que se incrementa rápidamente entre los 20 y 60 días en las semillas cultivadas en KC y alcanzan su máximo en plantas maduras.

En KC sin sacarosa, las concentraciones de RuBP alcanzan su máximo lentamente alrededor de los 60 días, incrementándose ligeramente después. En el medio de KC sin sacarosa el pico es evidente a los 60 días, después fue seguido por un declive.

La enzima que está implicada o presente en la incorporación inicial de CO₂ por el ciclo de Calvin durante la fotosíntesis es la RuBP. Por lo tanto la producción de ésta enzima puede ser uno de los eventos que ocurren en las semillas cuando la cantidad de carbohidratos es suficiente. En otras palabras, la producción de la RuBP es un evento bioquímico importante para el establecimiento de autótrofos y requiere de una fuente externa de energía. (Harrison, 1973, 1977; Harrison y Arditti, 1978).

3.7.6 FACTORES AMBIENTALES

El ambiente ejerce un efecto importante sobre la fisiología y desarrollo de las semillas de Orquídea. Desafortunadamente existen pocos trabajos al respecto. La germinación de semillas en contenedores herméticos es igual o mejor que con un amplio intercambio de gases, (atmósfera ambiental) (Arditti, 1967, 1979)

Semillas de *Calanthe discolor* y *C. discolor* x *C. sieboldi* germinaron igual en condiciones aireadas que en tubos de ensayo.

Protocormos de *Cymbidium* desarrollaron brotes y raíces en un medio de cultivo poco profundo. La diferenciación se inhibió cuando se sembraron a profundidad pero la cantidad de protocormo se incrementó. (Homes et al, 1971). Crecimiento y diferenciación se inhibió cuando se empleó nitrógeno lo cual indica que el crecimiento de las plántulas mejora con la aereación lo cual se suministra adicionando al medio de cultivo carbón activado. Semillas de *Galeola celestionalis* germinaron sólo en envases aireados con una presión de aire de 1.8 atmósferas (Nakamura, 1962, 1964, 1975) y 8% de dióxido de carbono (26,000 % de lo normal). La mejor germinación ocurrió bajo un 10 % de O₂ (20 % es el contenido normal en la atmosfera), 6% de CO₂ (0.032 % es el contenido normal) y 84 % de N (80 % de lo normal) a presión de 1.4 kg/cm².

Existen muchas diferencias en cuanto a requerimientos atmosféricos para la germinación de las semillas de muchas Orquídeas, entonces no existe un patron el cual indique los puntos óptimos además de que las Orquídeas desarrollan habilidad para adaptarse a muchas diferencias fisiológicas.

3.7.7 ILUMINACION

La germinación de las semillas de Orquídea y el desarrollo de las plántulas varía de acuerdo a los requerimientos y respuestas a la luz y/o fotoperíodo (Arditti, 1979).

Desafortunadamente los datos al respecto son insuficientes y dan lugar a las siguientes generalizaciones:

Las especies epífitas germinan en la luz y en la obscuridad, al parecer requieren de luz para mejorar la inducción de brotes y/o la formación de raíces. Un número considerable de especies germinan mejor en medios oscuros, utilizando como fuentes al carbón activado. Este fenómeno se observó primero en los

protocormos de *Eynsidium* (Werkmeister, 1970,1975). Una explicación para ello fue que que el carbón activado es una fuente de microelementos . Un análisis del carbón activado indica que esta sugerencia era incorrecta ya que se hizo un extracto de agua con carbón activado y no provocó crecimiento y los supuestos microelementos del carbón activado también se encontraban en el medio de cultivo ya que éstos eran aportados por las impurezas de los componentes. En el cuadro No 4 se muestra un análisis espectroscópico de agua conteniendo carbón activado.

CUADRO No. 4 ANALISIS DEL CARBÓN ACTIVADO, BASADO EN SU PESO.

ELEMENTO	N EXTRAIDO	N EXTRAIDO DEL AGUA
Na	0.35	0.344
K	0.17	0.139
Ca	0.034	Traza
Mg	0.048	0.024
Mn	0.020	0.008
Si	0.26	0.24
Al	0.11	0.063
Sn	0.006	0.003
Fe	0.041	Traza
Cu	0.001	0.0007
Zn	0.082	Traza
Mo	Traza	--
B	0.0004	Traza

Fuente: Arditti, 1979.

Una segunda explicación, establece una polaridad por el medio obscuro de tal manera que se incrementó la formación de raíces, eliminando la diferenciación (Werkmeister, 1971). El crecimiento con carbón activado es igualmente bueno en un medio transparente, lo cual sugiere que el crecimiento tiene que ver con la aireación de las semillas y plántulas.

3.7.8 TEMPERATURA

La temperatura óptima para la germinación de las semillas de la mayoría de las especies de Orquídea se encuentra dentro de un rango que va de los 20° a 25° C, este rango se puede extender desde los 6° hasta los 40° C (Arditti, 1967; Mukherjee, 1974; Thompson, 1977; Whitner 1959).

Diferentes especies, al parecer requieren de frío (Stoutandre, 1974) o pueden tolerar el frío en almacén (Vöth, 1976). Sin embargo, estas especies también germinan a 25°C. (Harvais, 1973).

3.7.9 pH

Algunos datos indican que el pH óptimo para la germinación de las semillas de Orquídea es de 4.8 a 5.2, este rango se puede extender de 3.6 a 7.6 (Arditti, 1967, 1979). Las plántulas pueden tolerar ácidos y crecen bien en pH de 3.3 a 3.7 (Ernst, 1967, 1979).

Los efectos del pH sobre la supuesta dormancia en la obscuridad son resultados erráticos y cuestionables (Reyburn, 1978).

3.7.10 VITAMINAS

Los efectos de las vitaminas sobre la germinación de las semillas se ha estudiado frecuentemente en las dos últimas décadas (Arditti, 1967, 1979; Arditti y Ernst, 1974).

Se han realizado algunos estudios con las vitaminas A, B₂, D, E y T (las cuales son descritas como extractos de termita), ácido ascórbico (Vitamina C), Biotina, Acido fólico, inositol; este follol en algunos casos ha sido clasificado como un factor general de crecimiento mejor que vitamina, la Niacina, Acido pantotónico, Piridoxina, Rovoflamina, Tiamina y componentes relacionados como fuente de ácido p-aminobenzoico, Glutación y otras sustancias que pueden ser protectoras de los efectos sobre la germinación y crecimiento de las plántulas. La vitamina que aparece en la mayoría de los trabajos es la Niacina, la cual se está reportando desde hace 40 años. (Noggle y Wynd, 1943). Las últimas evidencias indican que la simbiosis con un hongo suministra a las Orquídeas vitaminas o sus precursores. (Harvais y Pekkala, 1975; Hijner y Arditti, 1973). El ácido fólico no tiene un efecto virtual en el medio de cultivo para las Orquídeas. Al parecer las Orquídeas pueden ser autosuficientes con respecto a esta vitaminas.

La niacina se incrementa durante la germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas, en cantidades superiores en comparación con otras vitaminas (Arditti, 1967, 1977); estos descubrimientos indican que las Orquídeas pueden satisfacer sus requerimientos con una micorriza en la naturaleza. Esta suposición se basa en que la niacina es liberada en el medio de cultivo por Rhizoctonia. Las plántulas de Orquídea y sus hojas sintetizan niacina por la vía triptófano (Arditti y Tarr, 1979; Hijner y Arditti, 1973).

La Tiamina presenta un caso interesante, ya que las investigaciones revelan que esta vitamina incrementa germinación y crecimiento de las plántulas.

3.7.11 HORMONAS

Los resultados que se tienen al emplear hormonas sobre las plántulas de Orquídea como las auxinas, citocininas y giberelinas son inconclusos y poco confiables (Arditti, 1967, 1979; Whitner, 1959, 1979).

Las razones para explicar esto es :

(1) Pueden ocurrir interacciones entre las sustancias por las diferentes combinaciones de hormonas con o sin sustancias adicionales, el cultivo y sus condiciones; así como las plántulas empleadas.

(2) Las respuestas y requerimientos fisiológicos pueden variar de acuerdo a la especie y género.

(3) Formas diferentes y análogas de cada hormona empleada.

(5) Un amplio rango en dosis y concentraciones.

(6) La edad de las plántulas puede afectar las respuestas.

(7) La madurez de las semillas.

LAS AUXINAS QUE COMUNTEMENTE SON EMPLEADAS EN EL CULTIVO DE TEJIDOS

Las auxinas Acido indol-acético (AIA), Acido indolbutírico (AIB), Acido naftalenacético (ANA) y el Acido 2-4 Diclórofenoxiacético (2-4 D). El AIA se produce en forma natural en las plantas y se adiciona al medio de cultivo en concentraciones de 0.01 a 10 mg/l, y las Auxinas sintéticas que son relativamente más estables y activas AIB, ANA y 2-4 D, se emplean en concentraciones de 0.001 a 10 mg/l.

Las auxinas promueven la elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo) y formación de raíces adventicias, frecuentemente inhiben la embriogénesis en cultivos en suspensión (Kyte, 1987, Pierik, 1990). Las auxinas son comúnmente combinadas con las citocininas durante la fase de multiplicación y sin las citocininas promueven el enraizamiento. (Kyte, 1987).

Las auxinas fueron las primeras en adicionarse al medio de cultivo de las Orquídeas desde hace más de 50 años, obteniéndose resultados variables. (Burgeff, 1934; Withner, 1969, 1974). En la mayoría de los casos el ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB) y ácido naftalen acético (ANA) los cuales incrementan la germinación y el crecimiento de las plántulas. La inhibición es reportada en muy pocos casos con algunas

excepciones (los ovarios de Dendrobium mueren si hay ausencia de auxinas. (Israel, 1963).

Las polinias de las Orquídeas contienen grán cantidad de auxinas y sólo se han detectado trazas de estas hormonas en semillas de Cypripedium y son inexistentes en Dendrobium, Calanthe (Arnoldi y Zinger, 1961). Estos descubrimientos y la poca confiabilidad de los reportes en cuanto a los efectos de las auxinas en el medio de cultivo indican que, en general, la germinación de las semillas de Orquídeas así como el desarrollo de las plántulas no requieren de una fuente exógena de esta hormona.

CITOCININAS

Las citocininas más comunes en el cultivo de tejidos son la Kinetina (K), la Bencil aminopurina (BA), 6-(Y,Y-dimetilalilamino) purina (" " 2IP ") y 6-(bencilamino)-9-(2-tetrahidropirani)-9H-purina (PBA). Las citocininas estimulan la división celular, si van acompañadas de una auxina, inducen a la formación de vástagos adventicios, en concentraciones elevadas (1 a 10 mg/l), sin embargo inhiben la formación de raíces , la dominancia apical y retardan el envejecimiento (Kyte, 1987 y Pierik, 1990).

Se tienen evidencias de que algunas micorrizas producen citocininas pero ninguna esta asociada con las Orquídeas (Cartte y Miller, 1974; Miura y Hall, 1973). Si la germinación de las semillas de Orquídea y/o desarrollo de las plántulas requieren de una fuente exógena de esta hormona, es posible también que en un ambiente natural estas necesidades sean satisfechas por un hongo. El crecimiento in vitro de diferentes especies de Orquídeas se aumenta por la acción de las citocininas. El crecimiento de otras se inhibe. (Arditti,1979; Withner,1974). La Benzil aminopurina (BAP) se reporta como retardante para el desarrollo y diferenciación de las células y tejidos de Cymbidium así como de protocormos de la misma especie. (Gallhofer y Thaler, 1975). Esta hormona puede generar un alargamiento de la mitocondria en la luz

En adición de BA, induce e incrementa el número de cloroplastos juvenes y retarda su degeneración . (Gailhofer y Thaler, 1975). La combinación de Auxina:Citocinina, puede ser muy importante en algunos casos (Hadley y Harvais, 1968, Uesato, 1978).

La germinación de las semillas es más sensible a altas concentraciones de citocininas en comparación al desarrollo de los protocormos, estos sugiere que las semillas pueden tener bajos o nulos requerimientos de citocininas. Por otro lado, los protocormos pueden ser incapaces de sintetizar citocininas. De esta manera se puede decir que los embriones no necesitan de citocininas.

GIBERELINAS

Las giberelinas no son empleadas en el cultivo in vitro, debido a que no son esenciales . Existen 34 giberelinas que han sido identificadas, pero debe tenerse en cuenta que son sensibles al calor; se pierden durante el autoclaveado (Van Bragt et al, citado por Pierik, 1990). Inducen elongación de entrenudos y crecimiento de los meristemas o yemas in vitro . (Kyte y Pierik, 1990).

En general, los efectos de una fuente exógena de giberelinas sobre plántulas de Orquídea es negativo, al parecer las plántulas sintetizan tantas como las vayan necesitando.

INTERACCIONES ENTRE HORMONAS

La información disponible con respecto a los efectos de la interacción entre hormonas sobre las plántulas de Orquídea es limitada. Según reportes, las combinaciones de auxinas y citocininas (Ksumoto, 1978, 1979) pueden aumentar el crecimiento, pero los efectos de estas combinaciones varían con las hormonas empleadas, sus concentraciones, proporciones y especie. Las citocininas, especialmente la benziladenina , incrementan la multiplicación de protocormos. La formación de brotes a partir de

protocormos de *Cymbidium* fueron incrementados por una combinación de 0.01 mg/l de 2-4 D plus y 1 mg GA₃/l, pero ésta combinación llevó a los brotes a tener malformaciones (Ksumoto, 1979).

3.7.12 COMPLEJOS ADITIVOS

Un gran número de complejos aditivos son adicionados al medio de cultivo de las semillas de Orquídea. Extracto de levadura, agua de coco, peptona, preparaciones microbiológicas extractos naturales, caseína hidrolizada (Kukulczanka y Sobrecocznski, 1974), que son los aditivos más conocidos; también se emplea el jugo de Kulin, miel, savia, emulsión de pescado y extractos de carno, estos últimos son poco usados, extractos de pupas de gusano de seda y cerveza de Malasia, los cuales pueden ser los mejores y han sido descritos como exóticos.

3.7.13 RAYOS GAMMA

Las semillas de Orquídea y los embriones son órganos convenientemente empleados en estudios de radio-sensitividad porque contienen muy pocas células. Semillas de *Dendrobium nobile* fueron irradiadas con 10, 20, 30, 40, 60 y 80 KR de rayos gamma de Cs (137) y Co (60) las cuales germinaron en bajas proporciones, comparándolas con los testigos durante los primeros tres meses se observó que las plántulas sobrevivientes se localizaron dentro del rango de los 10 a 30 KR. Las irradiaciones en todos los casos produjeron malformaciones.

3.7.14 FORMACION DE PROTOCORMOS

La formación de esta estructura presenta gran interés en las Orquídeas, gracias a la existencia de esta estructura organógena particular, EL PROTOCORMO, la multiplicación vegetativa puede realizarse en un estado precoz del desarrollo con un nivel de

proliferación no igualado por otras especies.

El comportamiento de las Orquidáceas ha sugerido la posibilidad de extender el método a otras especies vegetales. El protocormo resulta ser un modelo experimental de alto interés para la investigación sobre la organogénesis.

3.7.15 PROTOCORMO DE GERMINACION

El desarrollo de las Orquidáceas es muy particular, ya que las semillas tienen un embrión muy pequeño con un número relativamente bajo de células.

En condiciones normales, el desarrollo ulterior puede estar ligado a las sustancias aportadas por los hongos que forman micorrizas con las raíces (Bernard, 1909). Sin embargo la siembra puede hacerse en medios nutritivos simples.

"El protocormo de germinación" que procede del embrión y, como consecuencia, de la semilla, lleva generalmente una yema terminal y una corona de rizoides. Sin embargo, las raíces, siempre adventicias se formarán más tardíamente en la base de los nudos de los tallos con hojas.

El protocormo recubierto de una epidermis, es una estructura organógena que puede producir otros protocormos por gemación adventicia. La fragmentación y división de estos protocormos, provoca la formación de protocormos adventicios a partir de tejidos superficiales. El protocormo puede formarse sin que se le vea organizar un meristemo primario bien estructurado. La organización de meristemas primarios puede seguir a la formación del protocormo en lugar de precederla. Estos meristemas pueden evolucionar hacia tallos con hojas disponiéndose éstas según su filotaxia.

IV.- MATERIALES Y METODOS

4.1 UBICACION DEL EXPERIMENTO

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la carrera de Ingeniería Agrícola de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Mex.

4.2 MATERIAL VEGETAL EMPLEADO

Se utilizaron cápsulas abiertas de *Calasekum* sp. donadas por institutos de investigación de la propia UNAM, el material donado se encontraba en condiciones de invernadero (Jardín Botánico Interior, Ciudad Universitaria).

4.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental que se utilizó para el análisis de datos fue un DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR. El diseño se compuso de 6 tratamientos con 6 repeticiones cada uno. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey al 0.1% y 0.5% de significancia. En el cuadro No. 5 se muestra la organización del experimento (pag. 58).

4.4 MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo empleado en todo el experimento para promover la germinación de las semillas fue el de Murashige y Skoog (MS) al 50% de su concentración de sales minerales, suplementándose con reguladores de crecimiento y agua de coco respectivamente para cada tratamiento. Se tomó como base el cuadro de composición del medio de cultivo de MS, el cual se muestra en la pag. 59.

4.5 DESINFECCION Y SIEMBRA DE LAS SEMILLAS

De comunicación personal con Cruz Pizarro en 1993 se propone la siguiente metodología para cápsulas abiertas y desinfección de semillas individualmente:

a) Obtener con un bisturí limpio la cantidad aproximada de semillas, considerando el número de tubos que se vayan a sembrar

b) Sumergir las semillas en una solución desinfectante.

c) Transcurrido el tiempo de desinfección, se coloca en un filtro de naigén un papel filtro del No. 2 para de ésta manera vertir la solución y obtener las semillas.

Una vez desinfectadas las semillas y con ayuda de la campana de flujo laminar se enjuagan las semillas con agua destilada esterilizada 2 o 3 veces, durante el proceso de enjuagado se deben tener encendidos los mecheros para obtener un alto porcentaje de asepsia.

Se procede a la siembra de las semillas en los tubos conteniendo medio de cultivo, se toma una cantidad pequeña de semillas con la punta de un bisturí flameado previamente y se siembra. Las semillas se extienden sobre toda la superficie del medio de cultivo. Durante el proceso de siembra, los mecheros así como el material de cristalería y utensilios deberán de estar flameándose continuamente.

4.6 CONDICIONES DE INCUBACION

Después de haber realizado la siembra, se colocan los tubos en el cuarto de cultivo en donde existe un ambiente controlado; se tiene un fotoperiodo de 16 hrs con una intensidad lumínica de 3000 lux, la temperatura dentro del cuarto de cultivo se encuentra dentro de un rango de $27 \pm 1^{\circ} \text{C}$.

4.7 TOMA DE DATOS

Los datos para obtener porcentajes de contaminación se tomaron cada tres días. Los datos para la evaluación de germinación se tomaron cada semana a partir de que los embriones se tornaron verdes observándose éstos al microscopio para determinar el porcentaje de germinación.

4.8 FECHA DE SIEMBRA

La fecha de siembra del testigo fue el 28 de agosto de 1992, los tratamientos se fueron sembrando a los días posteriores a partir de la siembra del testigo.

Cuadro No. 5. Organización del experimento.

TRATAMIENTO 1	0.1 mg/l AIB 0.1 mg/l BA
TRATAMIENTO 2	0.1 mg/l AIB 0.1 mg/l BA agua de coco
TRATAMIENTO 3	agua de coco
TRATAMIENTO 4	0.1 mg/l Kinetina 0.5 mg/l AIB
TRATAMIENTO 5	0.5 mg/l Kinetina 0.1 mg/l AIB
TRATAMIENTO 6	TESTIGO (MEDIO DE CULTIVO)

Cuadro No. 6. Medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962). Soluciones concentradas.

SALES INORGANICAS			
MACROELEMENTOS (mg/l)		MICROELEMENTOS (mg/l)	
KNO_3	1900	$\text{Mn SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16.9
$\text{NH}_4 \text{NO}_3$	1650	H_3BO_3	6.2
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	KI	0.83
KH_2PO_4	170	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	74.50	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
COMPUESTOS ORGANICOS			
Ac. nicotínico	0.5 mg/l	Mio-inositol	100 mg/l
Glicina	2.0 mg/l	Tiamina	0.1 mg/l
Piridoxina	0.5 mg/l	Sacarosa	30.0 g/l
		Agar	7.5 g/l

V. - RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

GERMINACION DE SEMILLAS

Withner (1943) indica que para el cultivo de óvulos de Orquídeas, es necesario e importante considerar el tiempo entre polinización y fertilización para obtener resultados en el proceso de germinación y crecimiento de los embriones.

Withner, menciona que para cada especie de Orquídea el tiempo de fertilización es diferente. En esta investigación, las cápsulas empleadas permanecían ya abiertas, se consideró el hecho de que las semillas habían sido fertilizadas para presentarse como tales. Lo que no se sabía con seguridad fue el tiempo o edad de la cápsula, factor de vital importancia dado que se pudo haber estado trabajando con cápsulas viejas y por lo tanto con semillas poco viables.

La juvenilidad de la cápsula se pudo comprobar en un ensayo de viabilidad (no registrado), después de 8 meses de haber sembrado las semillas del experimento, se realizó la siembra de dichas semillas con cantidades semejantes a las del experimento, los porcentajes de germinación en un medio sin reguladores de crecimiento fueron bajos en comparación con los obtenidos en el experimento de investigación, este ensayo nos mostró que el factor de la edad en las cápsulas es determinante para tener semillas viables.

Lo anterior se confirma con lo dicho por Lucke (1971), citado por Pierik (1990) quien afirmó que las semillas de Orquídea no se deben sembrar cuando la cápsula ha llegado a sus dos terceras partes de su madurez.

Withner (1943), desarrolló una técnica la cual aportó algunas respuestas, especialmente concernientes a la supuesta dormancia de las semillas de Orquídea y a los factores necesarios para el crecimiento del embrión. El consideró que dicha dormancia no se presenta cuando se siembran las semillas en un medio de cultivo simbiótico y sin considerar factores, tales como el pH.

Bernard (1909) , afirma que las Orquídeas viven en relación simbiótica con un hongo y por lo tanto, para su cultivo se necesita un medio de cultivo simbiótico.

Este experimento, no se realizó con medios simbióticos por que se sabe que algunos elementos que están dentro del contenido del medio de cultivo son los que proporciona el hongo en condiciones naturales, otra razón fue para observar el efecto directo de los reguladores de crecimiento en el crecimiento de los embriones hasta llegar a plántulas autótrofas.

La germinación y obtención de resultados se apoya en lo dicho por Knudson (1922) quién demostró que la germinación de semillas de Orquídea era posible aún en un medio de cultivo sencillo el cual estuviera compuesto por minerales y azúcares y sin la presencia de hongos. Knudson menciona que el éxito o fracaso no depende directamente en inocular o no micorrizas al medio de cultivo; él establece que para cada especie de semillas de Orquídea las condiciones de cultivo pueden ser diferentes, desde el medio hasta la forma de esterilización de las semillas.

PORCENTAJE DE GERMINACION

Los porcentajes de germinación obtenidos en el experimento fueron los siguientes:

- Para el tratamiento 1 36.18 %.
- Para el tratamiento 2, 34.04 %.
- Para el tratamiento 3, 27.83 %.
- Para el tratamiento 4, 33.58 %.
- Para el tratamiento 5, 31.99 %.
- Para el tratamiento 6, 68.17 %.

Los días a la germinación en todos los tratamientos fue de 62 días a partir de que los embriones se tornaron verdes.

Cabe mencionar que los resultados obtenidos superan a los reportados por Lee Zarate (1992), quienes reportan nulos o escasos resultados de germinación.

Con respecto a los experimentos realizados por Katiyar y Sharma (1987), con semillas de Orquídea de *Coelogyne punctulata* y *Aerides multiflorum*; la germinación de las semillas de ambas especies fue a los 90 días, presentando un porcentaje de germinación del 81.4 % para *Aerides multiflorum*. El medio en que se desarrolló el experimento fue el de Knudson C (suplementado con 100 g de pulpa de plátano).

Sharma y Tandon , sembraron semillas de *Cymbidium elegans*, *Coelogyne prolifera*, *C. cristata*, *C. praelecta* , *Aerides multiflorum*, *Thunia alba* en el medio de cultivo de Knudson C y el medio de Vacin y Went; los mejores porcentajes de germinación se obtuvieron en el medio de Knudson y fueron del 80 % para *Aerides multiflorum* y de un 14 % para *C. prolifera*.

De la misma manera Paek y Shim (1989) llevaron a cabo un experimento con semillas de *Cymbidium* obteniendo un promedio de días a la germinación de 277 y en dicho experimento no se reporta el porcentaje de germinación. El experimento se realizó sobre el medio de Knudson.

En los experimentos antes mencionados se enlistan altos porcentajes de germinación, en esta investigación se obtuvo un 68.17 % de germinación en tan sólo 62 días, podemos mencionar que se tienen niveles de germinación parecidos a los reportados en la bibliografía considerando que en esta investigación el tiempo fue relativamente más corto en comparación a los experimentos reportados. Otro factor importante es que en la bibliografía se reporta que los experimentos se realizaron sobre el medio modificado de Knudson C y no se tienen evidencias de que se haya empleado el medio de Murashige y Skoog, (medio de cultivo empleado para la realización de esta investigación) para inducir la germinación de las semillas de Orquídeas.

Por otro lado; Bidwell (1979) menciona que la mejor fuente posible de nutrientes para el crecimiento embrionario es el endospermo y la adición de leche de coco al medio de cultivo, lo cual puede hacer factible el cultivo de embriones en etapas muy tempranas de desarrollo.

En dos de los tratamientos llevados a cabo en el experimento se adicionó agua de coco, desafortunadamente en estos tratamientos se presentó el más alto porcentaje de contaminación, en contra parte, se observó que las semillas cultivadas en este medio tenían un crecimiento más acelerado en comparación con el testigo, se podrían hacer más investigaciones al respecto sobre el control de la contaminación y contenido exacto del agua de coco después de haber sufrido el proceso de esterilización por autoclave.

Conklin y Overbeek (1941) sugirieron que el agua de coco podría ayudar en el cultivo de embriones. Ellos trabajaron con explantos de zanahoria y obtuvieron gracias al agua de coco una proliferación más activa, afirman que en el contenido del agua de coco había trazas de auxinas lo cual mejoró la proliferación.

En nuestro experimento, como se mencionó, el crecimiento de los embriones fue en comparación con el testigo, mayor; pero en realidad no se sabe el contenido exacto del agua de coco y tampoco los cambios que sufre en su composición durante el autoclaveado, de la misma manera sucede con los compuestos orgánicos que se adicionan al medio de cultivo.

EMPLEO DE REGULADORES DE CRECIMIENTO

Citocininas

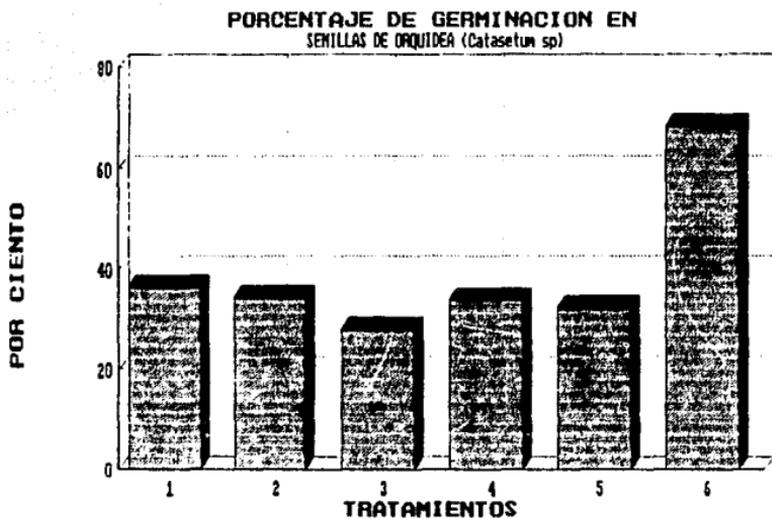
En los tratamientos 1,2,4 y 5 se usaron citocininas, el desarrollo de las semillas fue extremadamente lento, el efecto de las auxinas fue al parecer negativo para el desarrollo del proceso de germinación y crecimiento de los protocormos. A pesar del tamaño de las semillas, se suponía que habría necesidad de suplementar al medio de cultivo citocininas, (Kinetina y BA). De acuerdo con Arditti (1984), la germinación de las semillas de Orquídea es sensible a las altas concentraciones de citocininas, esto sugiere que las semillas tienen o pueden sintetizar citocininas y que por lo tanto la suplementación de auxinas al medio de cultivo no es necesaria.

Auxinas

De igual manera, en los tratamientos, 1,2,4 y 5 se utilizó AIB. (regulador de crecimiento con auxinas). Como se mencionó, el desarrollo de las semillas fue lento y los porcentajes de germinación bajos. Arnould y Zinger (1961), mencionan que las polinias de las flores de las Orquídeas llevan trazas de estas hormonas, estos descubrimientos indican que en general, la germinación de las semillas de las Orquídeas así como el desarrollo de las plántulas no requieren de una fuente exógena de esta hormona.

En la figura No.7 se muestran los porcentajes de germinación obtenidos en cada tratamiento.

Figura No. 7 Gráfica de los porcentajes de germinación obtenidos en el experimento.



Cuadro No. 7 Análisis de varianza y prueba de Tukey.

FV	GL	ANOVA		Fc	Ft	
		SC	CM			
Trat	5	5,425.93	1,085.18	25.0	3.90	0.1**
Error	24	1,040.34	43.34		2.02	0.5*
Total	29	6,466.27				

Tukey 0.1= 5.37 Niveles de significancia.

0.5= 4.37

$$5.37 \sqrt{\frac{4.37}{5}} = 15.81$$

Cuadro No. 8. Prueba de tukey

PRUEBA DE TUKEY AL 99%	
68.17	- 15.81 = 52.32 a
36.18	- 15.81 = 20.37 b
34.04	- 15.81 = 18.23 b
33.58	- 15.81 = 17.67 b
31.99	- 15.81 = 16.08 b
27.83	- 15.81 = 12.02 b

El coeficiente de variación obtenido fue de 17.3 %.

El método de desinfección empleado en el experimento resultó ser efectivo en todos los tratamientos. Los porcentajes de contaminación que se tuvieron se debieron a factores no determinantes. Los resultados presentados se prestan a ser discutidos porque sólo en la mitad del experimento se registro contaminación, en el tratamiento 1, se presentó contaminación tal vez porque las condiciones de de asepsia no fueron las suficientemente cuidadas y porque fue el primer tratamiento sembrado.

En los tratamientos 2 y 3, se observó el más alto índice de contaminación, el echo de que se suplementara el medio de cultivo con agua de coco representó un alto riesgo de contaminación dado su origen y por que el contenido real del compuesto después del proceso de esterilización se desconoce. Tal vez, el crecimiento de los embriones desarrollados dentro de este tratamiento fue relativamente más rapido pero el hecho de que se presenten porcentajes de contaminación como los que se tuvieron dan paso a que se considere bastante la idea de suplementar compuestos orgánicos al medio de cultivo, no porque se afirme que no son buenos ni mucho menos que no sirven para nada, si no que se desconoce totalmente su composición posterior al proceso de esterilizado y por lo tanto se desconoce también que es lo que se le está agregando al medio de cultivo lo que es aún más grave, porque en el caso de que se tuviesen excelentes resultados no se le puede atribuir todo el éxito al medio de cultivo, tampoco al proceso de agregar o no reguladores de crecimiento, etc. Se puede hacer investigación sobre el efecto real de estos compuestos si existiese alguna manera de saber la composición después de haber sido sometidos a algún método de esterilización.

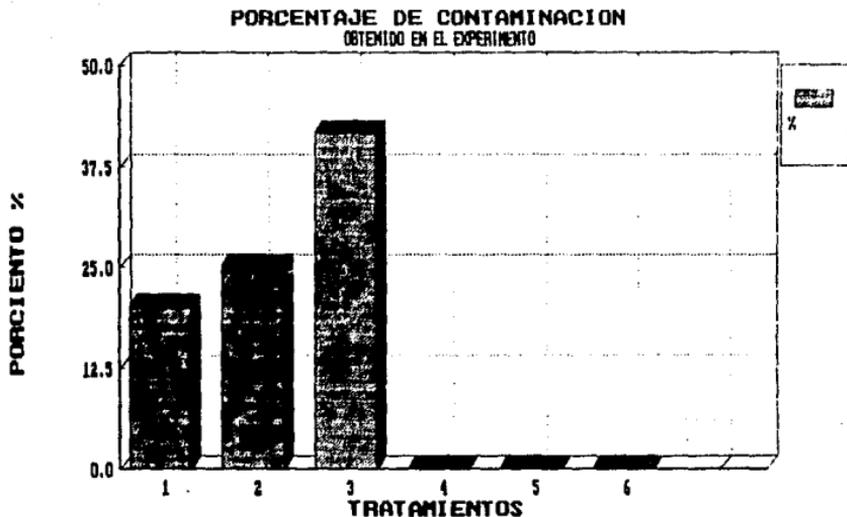
De alguna manera dicho método si resultó eficiente, es preciso mencionar que se debe tener mucho cuidado en el manejo de concentraciones, tanto del etanol (primera parte de la desinfección) como del hipoclorito de sodio; ya que en estos pasos aparentemente sencillos de llevar a cabo puede estar el éxito o fracaso de cualquier investigación.

El procedimiento de desinfección es parecido al de Pierik (1990) quien dice que la esterilización de cápsulas abiertas o de semillas en forma individual, constituye un proceso delicado. Pierik colocó las semillas en un matraz conteniendo 10 % de NaCl con una concentración de 2 - 5 %, añadiendo Tween 20 u 80 (detergente biológico). El tiempo de esterilización fue en su experimento de 5 - 10 minutos; menciona que en su caso las semillas viables permanecieron en el fondo del matraz. Al final lavó con agua destilada esterilizada.

En la figura No. 8 se dan a conocer los porcentajes de cotaminación y tratamientos en donde se tuvo.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Figura No. 8. Porcentajes de contaminación y tratamientos en donde se observó.



VI.- CONCLUSIONES

1.- El adicionar o suplementar compuestos orgánicos como por ejemplo agua de coco, extractos naturales, etc., al medio de cultivo es un tema que debe ser analizado dado que las composiciones de dichos extractos pueden cambiar a la hora del autoclaveado. Es por ello que no se considera factible suplementar al medio de cultivo extractos naturales, más aún cuando se desconoce su composición orgánica.

2.-Respecto a los porcentajes de contaminación obtenidos en el experimento, no fueron causa del método de desinfección empleado, es necesario aumentar el tiempo de esterilización del material de cristalería empleado así como ser más estricto en el lavado de dicho material.

3.-Los porcentajes de germinación obtenidos en la investigación superan a los obtenidos en experimentos reportados en otras instituciones. El testigo que no fue suplementado con ningún regulador ni compuesto orgánico, presentó el mayor porcentaje, y de acuerdo con la bibliografía, no es necesaria la adición de hormonas para incrementar la germinación de las semillas de esta especie, tal vez en la etapa de crecimiento sería interesante realizar un estudio con reguladores de crecimiento. Con respecto al agua de coco, aunque presentó el mayor índice de contaminación, el echo de que las semillas crecieran de una manera más rápida en comparación con el testigo y demás tratamientos es interesante hacer destacar que aunque de alguna manera incrementa el tamaño de los embriones más rápido, se presentan índices de contaminación altos lo que hace considerar la actividad de la suplementación de los compuestos orgánicos.

4.- El tiempo transcurrido a la germinación fue mejor en comparación con la mayoría de los trabajos reportados. Es importante mencionar que dicho tiempo tiene que ver directamente con el medio de cultivo empleado (MS 50%) el cual se considera que fué bueno para los tratamientos.

5.- El método de desinfección empleado fue efectivo para las semillas de *Calasetum* sp, sin embargo en ningún momento se debe de tomar como patrón para desinfectar semillas de otras especies, es decir, el método puede variar dependiendo el estado y condiciones de las semillas con que se este trabajando; para ello es necesario saber el género y especie de la semilla propuesta para trabajar con ella in vitro, ya que ello puede determinar los tiempos de desinfección y hasta concentraciones a utilizar.

6.- En ningún trabajo se reporta la forma de almacenar o mantener a las semillas, no se menciona ningún método de conservación, el método de conservación de las cápsulas fue bueno, (5°C) porque de alguna manera se previó contaminación por hongos (las cápsulas de Orquídeas son altamente susceptibles a la contaminación fúngica) e indirectamente se proporcionó un método pregerminativo para las semillas, es decir, cualquier cápsula debe tener un buen método de conservación.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Arditti J. 1984; Orchid Biology (Reviews and Perspectives) University of California. Irvine. Comstock Publishing Associates Cornell University Press. Ithaca and London.
- 2.- Arditti Yam, Watherhead, 1989; The use of darkening in seed germination and tissue culture media for Orchids; a review. Department of Developmental and cell Biology, University of Florida, Irvine, Cal. *AB.
- 3.- Bidwell R.G.S., 1979. Fisiologia vegetal. AG editor. México, D.F.
- 4.- Brunner 1990, in vitro germination of *Gevuina avellana* (Proteaceae). European-Juornal-Forest-Pathology. *AB.
- 5.- Caneva Silvio, 1978. Orquidea. Ed. Albatros, Buenos Aires, Arg. 5-65.
- 6.- Cruz P.F., 1983. Propagación in vitro de manzana (*Malus plumilla*, Mill); Tesis profesional, FES-Cuautitlan. México.
- 7.- Das Ghoshal, 1990. In vitro germination behaviour of some orchids seeds developed in plains of West Bengal. Indian-Agriculturist. *AB.
- 8.- Donald J. Frederick, 1992. "En Hawai, la industria de las Orquideas en peligro?" Mundo 21, National Geographic; News Service.
- 9.- Duran G.J., 1993. Cultivo in vitro de *Cordyline terminalis* a partir de segmentos nodales. Tesis profesional FES-Cuautitlan. México.
- 10.- FAO UNESCO, 1988. Fundamentos teorico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Editado por Cadmo H. Rosell. México.
- 11.- Fernández Emilio G., 1985. Las plantas con flores. Ed. Reverté S.A. España.
- 12.- Gamborg O.L. et al; 1976. Plant Tissue Culture Media in vitro 473-478.

- 13.- Gamborg O.L., Murashige T., Thorpe A., 1976. Plant Tissue Culture Media.
- 14.- Ghoshal D., 1989. In vitro germination behaviour of some orchids, seeds developed in plains of West Bengal. Department of Genetic and Plant Breeding, India. *AB.
- 15.- Hartman T.H. y Kester D.E., 1975. Propagación de plantas (principios y prácticas). Ed. Continental. México.
- 16.- Hartman Walter I., 1971. Introducción al cultivo de las Orquideas. Ed. Fournier, S.A.
- 17.- Holters Zimmer, 1990. Shoot regeneration from root tips of orchids in vitro. Gartenbauwissenschaft. Alemania. AB.
- 18.- Indraka K. Vasil, 1985. Cell Culture Somatic Cell Genetic of Plants. Vol. 2. Department of Botany. University of Florida, Florida. Academic Press.
- 19.- Katiyar Sharma, 1987. Asymbiotic seed germination and seedling development in *Coeogyne punctulata* and *Aerides multiflorum*. Department Bot. School Life. North-Eastern Hill University Shillong, Meghalaya. *AB
- 20.- Kyte Lydiane, 1987. Plants from Test Tubes and Introduction to Micropropagation. Ed. Timber Press, Portland USA.
- 21.- Larson Roy A., 1988. Introducción a la Floricultura. AG. Editor S.A. México, D.F. 119-146.
- 22.- Lee Zarate J, Espinoza H. Micropropagación de Orquideas a partir de semillas. Folleto informativo, Banco de México (FIRA).
- 23.- Lin C., 1987. Histological observation on in vitro formation of protocorm-like bodies from flower stalk internodes of *Phalaenopsis*. Corp All China Orchids, Yung-Ho, Taipei, Taiwan. *AB.
- 24.- Lin C., 1987. In vitro culture of flower stalk internodes of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis*. Laboratory of the All-China Orchids Corp. Taipei, Taiwan. *AB.

- 25.- Loma de la J.L., 1982. Experimentación agrícola. Ed. UTEHA.
- 26.- Lopes Jordao, 1988. An simple and rapid method for selection of viable orchid seeds. Departamento de Botânica/UNESP, Rio Claro, Brazil. *AB.
- 27.- Manning Staden, 1990. The development and mobilisation of seeds reserve in some African orchids. Department of Botany, University of Natal. Pietermaritzburg, South Africa. *AB.
- 28.- Margara J., 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro (Los meristemas y la organogénesis). Ediciones Mundi Prensa. Madrid, España.
- 29.- Maramorosch Karl, Himuri Hiroyuki, 1979. Practical Tissue culture Application. Nairobi, Kenya. Academic Press.
- 30.- Mashuhara G. Katsuya K., 1989. Effects of Mycorrhizal Fungi on Seed Germination and Early Growth of three Japanese Terrestrial Orchids. Institute of Agriculture and Forestry, University of Tsukuba 305 Japan. Elsevier Science Publisher B.V. *AB.
- 31.- Morales J.N., 1990. Conservación in vitro a mediano plazo de (*Vainilla planifolia* Andrew). Tesis Profesional C.P. Chapingo, México.
- 32.- Murashige T., 1974. Plant Propagation Through Tissue Culture. Ann Rev. Plant Phys.
- 33.- Ospina H. Mariano, Dressler L Robert, 1974. Orquídeas de las Américas. Litografía ARCO, Bogotá, Colombia.
- 34.- Paek Kim, 1989. Exploitation of temperate cymbidiums and establishment of a micropropagation system. I. Asymbiotic germination of temperate cymbidium and the effect of media and growth regulators on organogenesis. Department of Horticulture, Chungbuk National University. Republic Korea. *AB.
- 35.- Parra R.A., 1987. Cultivo in vitro y anatomía de ovulos de vainilla (*Vainilla planifolia* Andrews). Tesis Profesional, Chapingo, México.

- 36.- Pierik R. L.M., 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores.
Ed. Mundi prensa. Madrid, España.
- 37.- Richtev Walter, 1972. Orchid Care.
Ed. By Studio Vista Publishers. Great Britain.
12-119.
- 38.- Rittershausen Brian and Wilma, 1979. Orchids in colour.
Blanford press. London.
- 39.- Sheenan Thomas and Marion, 1979. Orchid Genera Illustrated.
Ed. By Nostrand Reinhold Company. New York.
- 40.- Smreciu Currah, 1989. Symbiotic germination of seeds of terrestrial orchids of North America and Europe.
Devonian Botanic Garden, University of Alberta, Edmonton, Canada.
*AB.
- 41.- Villegas M.A., 1991. Apuntes del curso de Micropropagación.
Colegio de Postgraduados.
Chapingo, México.
1-9.
- 42.- Waes J., 1987. Effect of activated charcoal on in vitro propagation of Western European orchids.
National Bot. Garden of Belgium Meise, Belgium.
*AB.
- 43.- Wiard A. Leon, 1987. An introduction to the Orchids of Mexico. Comstock Publishing Associates a division of Cornell University Press.
Ithaca and London.
- 44.- Withner Carl L., 1959. The orchids, A Scientific Survey.
Ed. The Ronald Press Company. New York.
Caps. 5-8-9-14.
- 45.- Zimmerman R.H. y Debergh P.C., 1991. Micropropagation Technology and Application.
Kluwer Academic Publishers, USA.