

30
24.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

EFECTO DE SACAROSA, GLUCOSA Y FRUCTOSA
SOBRE LA GERMINACION DE LAS SEMILLAS, EL
DESARROLLO Y CRECIMIENTO DE PLANTULAS
DE *Laelia speciosa* (H.B.K.) SCHLTR. CULTIVADAS
in vitro.

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ROSALINDA VELAZQUEZ VERGARA

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LA FUNDACION
DE INVESTIGACIONES

DIRECTOR: M. EN C. SUSANA LUNA ROSALES,

MEXICO, D. F.

1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**A los dos seres, a quienes respeto
y amo, porque me dieron la vida
y me han mostrado y enseñado
a vivir: A mis Padres**

**A mis hermanos
porque están siempre presentes
con su ayuda y entusiasmo.**

**A mis dos amores:
Sergio y Citlalli,
porque con su presencia
y alegría iluminan mi sendero
y transforman mi existencia**

AGRADECIMIENTOS

Un reconocimiento a la M. en C. Susana Luna Rosales por su valiosa ayuda y por las facilidades concedidas para la realización de esta investigación.

Un agradecimiento muy especial a I. Sergio Bernal Salazar por su ayuda en la parte de estadística y por sus valiosos comentarios y correcciones realizadas a este trabajo.

A la Bióloga Balbina Vázquez B., al Biólogo Carlos C., a la M. en C. Socorro Almanza y al M en C. Amadeo Barba A., por sus acertados comentarios y correcciones.

CONTENIDO

| | Pág. |
|---|------|
| Resumen | i |
| Índice de cuadros | ii |
| Índice de figuras | ii |
| Índice de gráficas | ii |
| Introducción | 1 |
| Objetivos | 4 |
| Antecedentes | |
| Semillas de orquideas | 5 |
| Germinación | 6 |
| Germinación simbiótica de orquideas | 7 |
| Germinación asimbiótica <i>in vitro</i> | 9 |
| Desarrollo de plántulas | 10 |
| Efecto de carbohidratos en orquideas | 11 |
| Efecto de carbohidratos en <i>Laelia speciosa</i> | 13 |
| Aspectos generales de las orquideas | 14 |
| Aspectos generales del género <i>Laelia speciosa</i> (H. B. K.) Schltr. Descripción botánica | 15 |
| Clasificación taxonómica | 16 |
| Material y Método | |
| Recolecta y almacenamiento del material biológico | 19 |
| Semillas | |
| Prueba de viabilidad | 19 |
| Morfometría | 20 |
| Medio de cultivo | 20 |
| Prueba de desinfestación del material biológico | 21 |
| Siembra | 21 |
| Condiciones de incubación | 22 |
| Germinación | |
| i) Efecto de la exposición al desinfestante | 22 |
| ii) Efecto de los carbohidratos | 22 |
| Índice de desarrollo durante la germinación | 23 |
| Crecimiento y desarrollo | 23 |
| Análisis y discusión de resultados | |
| Viabilidad | 25 |
| Morfometría | 26 |
| Desinfestación | |
| a) Efecto del tiempo de exposición al desinfestante | 27 |
| b) Efecto sobre la germinación | 29 |
| Efecto de los carbohidratos | |
| A) En la germinación | |
| 1) Influencia del tipo de carbohidrato sobre la germinación | 31 |
| 2) Influencia de la concentración de los carbohidratos sobre la germinación | 33 |

| | |
|--|----|
| B) En el índice de desarrollo (I. de D.) | |
| 3) Influencia del tipo de carbohidrato sobre el índice de desarrollo..... | 36 |
| 4) Influencia de la concentración de los carbohidratos sobre el índice de desarrollo | |
| de <i>L. speciosa</i> | 38 |
| Crecimiento y desarrollo | |
| Efecto del tipo de medio de cultivo sobre: | |
| I) La longitud de plántulas y raíces de <i>Laelia speciosa</i> | 42 |
| II) El número de brotes y raíces de <i>Laelia speciosa</i> | 45 |
| Efecto del tipo de carbohidrato sobre: | |
| III) La longitud de plántulas y raíces de <i>Laelia speciosa</i> | 46 |
| IV) El número de brotes y raíces de <i>Laelia speciosa</i> | 48 |
| Efecto de la concentración de los carbohidratos sobre: | |
| V) La longitud de plántulas y raíces de <i>Laelia speciosa</i> | 51 |
| VI) El número de brotes y raíces de <i>Laelia speciosa</i> | 52 |
| Conclusiones | 55 |
| Anexo | 56 |
| Bibliografía | 58 |

ÍNDICE DE CUADROS

pág.

| | |
|--|----|
| 1.- Tamaño promedio de las semillas de <i>Laelia speciosa</i> (H.B.K) Schltr | 27 |
| 2.- Evaluación de la desinfección de semillas de <i>L. speciosa</i> , (tratamiento con NaClO) | 28 |
| 3.- Evaluación de la desinfección de semillas de <i>L. speciosa</i> , tratadas con H ₂ O destilada estéril (testigo)..... | 28 |
| 4.- Estadios de desarrollo III, IV Y V, obtenidos durante la germinación de <i>L. speciosa</i> Con diferentes concentraciones y tipos de carbohidratos | 41 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| 1.- Planta completa de <i>L. speciosa</i> mostrando raíz, pseudobulbo y flor | 18 |
| 2.- Estadios de desarrollo durante la germinación del género <i>Laelia sp.</i> | 57 |

ÍNDICE DE GRÁFICAS

| | |
|--|----|
| 1.- Germinación de semillas de <i>L. speciosa</i> por efecto de la desinfección a los 14 días | 30 |
| 2.- Influencia del tipo de carbohidrato sobre la germinación de <i>L. speciosa</i> | 32 |
| 3.- Influencia de la concentración de los carbohidratos sobre la germinación de <i>L. speciosa</i> ... | 34 |
| 4.- influencia del tipo de carbohidrato sobre el índice de desarrollo de <i>L. speciosa</i> | 36 |
| 5.- Influencia de la concentración de los carbohidratos sobre el índice de desarrollo de <i>L. speciosa</i> | 39 |
| 6.- Influencia del tipo de medio de cultivo sobre la longitud de plántulas y raíces de <i>L. speciosa</i> | 43 |
| 7.- Influencia del tipo de medio de cultivo sobre el número de brotes y raíces de <i>L. speciosa</i> .. | 45 |
| 8.- Influencia de los carbohidratos sobre la longitud de plántulas y raíces de <i>L. speciosa</i> | 47 |
| 9.- Influencia de los carbohidratos sobre el número de brotes y raíces de <i>L. speciosa</i> | 49 |
| 10.- Influencia de la concentración de los carbohidratos sobre la longitud de plántulas y raíces de <i>L. speciosa</i> | 51 |
| 11.- Influencia de la concentración de los carbohidratos sobre el número de brotes y raíces de <i>L. speciosa</i> | 53 |

RESUMEN

Las orquídeas poseen variedad en su morfología, característica que es el resultado de grandes adaptaciones ecológicas, son un grupo único de plantas con especies de importancia ornamental y comercial y, debido a esto sus hábitats se han visto fuertemente deteriorados y destruidos; por tal motivo se les considera como un taxa vulnerable (Larson, 1988) A pesar de lo antes mencionado, hasta la fecha no existen muchos estudios que traten el cultivo *in vitro* de las orquídeas, en especial de *Laelia speciosa*.

Para la aportación de investigación básica sobre esta especie se determinó la condición biológica de las semillas por medio de la prueba de viabilidad, morfología y desinfección. Se evaluó el efecto que ejercen la sacarosa, glucosa y fructosa sobre la germinación de las semillas, el desarrollo y crecimiento de plántulas de *Laelia speciosa* cultivadas *in vitro*, para tal efecto se desinfectaron las semillas con NaClO y se cultivaron en un medio MS suplementado, con 30 g/l de sacarosa para evaluar el porcentaje de germinación y con diferentes carbohidratos, sacarosa, glucosa y fructosa a diferentes concentraciones 1, 3, 5, 7 y 10% para evaluar los estadios de la semilla durante la germinación. Estas últimas concentraciones de carbohidratos se emplearon para evaluar el crecimiento y desarrollo de las plántulas.

Los resultados muestran que las semillas de esta orquídea tienen un valor de viabilidad del 76%, las dimensiones de la semilla son de 0.53 a 0.57 mm de largo y de 0.17 a 0.18 mm de ancho, y para el embrión de 0.32 a 0.34 mm de largo y de 0.12 a 0.13 mm de ancho, el hipoclorito de sodio al 6.0% resultó efectivo para la desinfección de las semillas, los diferentes tiempos de exposición a éste no resultaron tóxicos para ellas y se obtienen porcentajes de germinación entre 80 y 100%.

Los análisis estadísticos (ANDEVA) revelaron que la germinación obtenida en las semillas de *Laelia speciosa* dependió del carbohidrato utilizado así como de su concentración. Con sacarosa a bajas concentraciones (1, 3 y 5%) la tasa de germinación, e índice de desarrollo es más alta que en glucosa y fructosa. En el medio Murashige-Skoog comercial (MS-C) marca Sigma, la sacarosa a bajas concentraciones promueve mayor longitud de las plántulas, mayor longitud de la raíz y mayor número de raíces, la glucosa a bajas concentraciones (1, 3 y 5%) promueve mayor número de raíces y, la fructosa a altas concentraciones (7 y 10%) siempre exhibe una promoción menor de estos parámetros.

Se concluye que, para la propagación *in vitro* de *Laelia speciosa* la sacarosa a concentraciones de 1, 3, 5% resulta más eficiente comparada con los otros carbohidratos.

INTRODUCCIÓN

La familia Orquidaceae es una de las más numerosas y diversas entre las plantas con flores. Son un grupo de monocotiledóneas muy conocido y apreciado en el mundo botánico, son notables por presentar flores que poseen rasgos y características interesantes, resultado de grandes adaptaciones ecológicas (Marden, 1990)

Representan un grupo único de plantas con especies de importancia ornamental y comercial, debido a su extracción, el deterioro y la destrucción de sus hábitats se consideran como un taxa vulnerable (Larson, 1988)

De las 35 000 especies de la familia Orchidaceae que se conocen, aproximadamente 1000 se encuentran distribuidas en la República Mexicana, de las cuales, un 35 % son endémicas; un ejemplo de ello es la especie *Laelia speciosa*, conocida comúnmente como "flor de mayo" o "flor grande", esta especie es endémica del Altiplano Central (Durango, Querétaro, Zacatecas, Aguascalientes, Jalisco, Guanajuato, Michoacán, Hidalgo, San Luis Potosí y Tamaulipas) (Halbinger, 1993), la cual ha sido establecida como una especie "vulnerable" por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (Hernández, 1992).

Las orquídeas son consideradas como un símbolo de la conservación de especies en peligro de extinción en el mundo, puesto que muchas son altamente populares para los coleccionistas; por lo que muy probablemente las orquídeas silvestres continuarán colectándose y como resultado de esto, la mayoría de estas especies llegarán a ser cada día más escasas y algunas se extinguirán (Hoshi *et al.*, 1994).

Recientemente se han realizado esfuerzos internacionales para la seguridad e inventario de plantas con flores en peligro de extinción con el objetivo de salvar a las más susceptibles (Rubluo *et al.*, 1989), y las orquídeas son uno de los ejemplos más notorios (IUCN, 1985).

El impacto de la extinción en el equilibrio ecológico es enorme porque la desaparición de una planta puede acarrear daños a otras especies dependientes o relacionadas. Al respecto Raven (1976) calcula que de 10 a 30 especies de plantas y/o animales pueden resultar afectadas.

Las semillas de las orquídeas son muy diminutas [miden desde 200 a 560 μ en longitud por 80-129 μ de ancho] (Arditti, 1992, Shushan, 1959) y se forman de miles a millones de ellas en un sólo fruto. Poseen un embrión poco diferenciado sin tejidos de reserva para nutrir al embrión durante la germinación. Durante este proceso el embrión se hincha, posteriormente se ensancha formando una masa globular de células de forma redonda y aplanada en su parte apical, denominada protocormo, a partir del cual se forman las primeras hojas, mientras que las primeras raíces aparecen después (Harrison y Arditti, 1978). En condiciones naturales, las semillas para germinar necesitan asociarse con un hongo simbionte apropiado que le proporcione azúcares simples, los cuales son esenciales para que se lleve a cabo la germinación (Tyson, 1990). En ausencia de éste hongo las semillas de orquídeas pueden germinar y desarrollarse como plántulas cuando se cultivan en un medio aséptico que contenga una fuente adecuada de carbohidratos simples (Ernst *et al.*, 1971, Harrison y Arditti, 1978). Cabe señalar que bajo condiciones naturales, las plántulas permanecen en etapa de protocormo hasta que son infectadas en su parte basal por un hongo simbionte apropiado. Después de la infección, los ápices del protocormo producen las primeras hojas y posteriormente las primeras raíces (Arditti, 1982).

Numerosas investigaciones realizadas con carbohidratos simples, han demostrado que la adición exógena *in vitro* provee una adecuada fuente de carbono para las semillas de orquídeas, obteniendo una excelente germinación y crecimiento, el carbohidrato que ha dado mejores resultados es la glucosa, seguida por la sacarosa y finalmente la fructosa (Withner, 1959, Larson, 1988). Sin embargo, Knudson (1922) (citado por Arditti, 1967) reportó que para una germinación satisfactoria de orquídeas epífitas el mejor carbohidrato es la sacarosa, seguido de fructosa y finalmente glucosa.

Por otro lado, existen trabajos de micropropagación los cuales muestran que los azúcares tienen una influencia favorable en el crecimiento de las plántulas, puesto que éstas asimilan los carbohidratos y algunas sustancias nitrogenadas que están presentes en el medio de cultivo (Tyson, 1990).

Un vegetal está formado principalmente por carbohidratos transformados y su crecimiento depende de capacidad fotosintética para producir productos asimilables, y estos determinan el proceso morfológico de las plantas, el cual incluye tanto el crecimiento y

desarrollo. El primero está caracterizado por un incremento en la cantidad de protoplasma, un incremento de tamaño y en general está relacionado con un aumento de masa, mientras que el desarrollo constituye los cambios de forma, así como el grado de diferenciación y el estado de complejidad alcanzados por el organismo, conformando con ello, un proceso cualitativo (Bonner, 1969).

Como se mencionó anteriormente, existe una relación simbiótica entre las orquídeas y un hongo simbionte, por tal motivo se han propuesto técnicas simbióticas y asimbióticas para la micropropagación de orquídeas, esto debido a que existen muchas controversias sobre esta relación. Sin embargo, para orquídeas epifitas los requerimientos para la germinación de semillas son muy específicos

El cultivo de *Laelia speciosa* es muy difícil fuera de su hábitat natural (Halbinger, 1993) y desafortunadamente sólo existen estudios de tipo poblacional (Hernández, 1992).

En este trabajo se realizó un cultivo asimbiótico de *Laelia speciosa* para evaluar el efecto de una fuente externa de carbohidratos constituida por sacarosa, glucosa y fructosa sobre la germinación de semillas y el crecimiento y desarrollo de plántulas bajo condiciones *in vitro*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

1. Determinar el efecto morfogénico de la sacarosa, glucosa y fructosa sobre la germinación y desarrollo de plántulas de *Laelia speciosa* cultivadas *in vitro*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.1 Determinar el tipo y concentración de los carbohidratos seleccionados más adecuados para la germinación.
- 1.2 Establecer el tipo y concentración de los carbohidratos seleccionados más adecuados para determinar en que tiempo se alcanza el mayor índice de desarrollo de las semillas.
- 1.3 Determinar el tipo y concentración de los carbohidratos seleccionados más adecuados para especificar en cual de estos se alcanza mayor desarrollo y crecimiento en las plántulas.

ANTECEDENTES

SEMILLAS DE ORQUÍDEAS

En los frutos de las orquídeas se producen de miles a millones de semillas. Estos se forman de los dos a los tres meses después de ser polinizadas las flores, son completamente cóncavos, trilobulares y maduran alrededor de los 10 a los 11 meses, en ocasiones más tarde (Arditti, 1992).

Las semillas de orquídeas en general son muy pequeñas, miden desde 200 μ a 560 μ en longitud y desde 80 μ a 129 μ de ancho (Shushan, 1959, Abraham y Vatsala, 1981, Arditti, 1992); pesan entre 0.3 y 6.3 μg (Abraham y Vatsala, 1981) Son de una estructura muy simple, no poseen ningún tejido nutritivo, poseen un embrión poco diferenciado, carente de endospermo (Strasburger *et al.*, 1988), este embrión es ovoide con una longitud promedio de 210 μ por 90 μ de ancho, excluyendo al suspensor, el cual está constituido por células muertas, las células del embrión varían en tamaño dependiendo de su localización, las de la punta meristemática son pequeñas, generalmente miden de 8-10 μm de diámetro, las células más grandes conforman el resto del embrión y se hace referencia a ellas como células basales. A pesar de que muchos autores mencionan que las semillas no tienen tejidos de reserva para nutrir al embrión durante la germinación, Harrison y Arditti (1978), Arditti y colaboradores (1981), Arditti (1992), mencionan que todas las células del embrión contienen reservas alimenticias. Los lípidos constituyen una gran porción de material de reserva y están presentes como cuerpos lipídicos. También se pueden observar los cuerpos proteicos pero se restringen a células situadas en las dos terceras partes del embrión esto es, en el área micropilar, el citoplasma es denso por la acumulación de las proteínas, y además se encuentran numerosos glóbulos de aceite.

El embrión mide 210 μm de largo y 90 μm de ancho, está unido por medio de varias fibras celulares a una membrana delgada llamada testa la cual es ligera, de color anaranjado o amarillo. Esta rodeado por un gran espacio de aire interior (Arditti, 1967), lo cual ocasiona que la semilla tenga la capacidad de flotar, tanto en el aire como en el agua (Abraham y Vatsala, 1981); por lo que están bien adaptadas a la diseminación por el viento y el agua.

El número de semillas producidas en cada cápsula oscila de 5000 a 6000 en algunos géneros y de 2 a 3 millones para otros (Rao, 1977). El elevado número de semillas recompensa las escasas posibilidades de germinación (Marden, 1990). En condiciones naturales después de ser infectadas por el hongo es seguro que germinen (Arditti, 1982); sin embargo, a causa del requerimiento del hongo simbiote, menos del 5% de semillas germinan en su ambiente natural (Rao, 1977).

La viabilidad de las semillas de orquídeas es muy variable. Algunas la pierden a los nueve meses, y otras hasta 18 meses (Arditti, 1967). El almacenaje de las semillas durante periodos prolongados puede crear lesiones celulares, además de que determina el mantenimiento de la integridad molecular (Osborne, 1980). La viabilidad de las semillas disminuye de acuerdo con su estado de madurez (Waes y Debergh, 1986). Además de que el fenómeno de dormancia en estas semillas es común (Arditti *et al.*, 1981).

El éxito en la germinación de *Laelia speciosa*, puede estar relacionado con las condiciones microambientales. La presencia de manchones de líquenes sobre las ramas de los árboles ofrece un sitio favorable para la germinación (Hernández, 1992).

GERMINACIÓN

El proceso de germinación, aunque con algunas diferencias, es similar entre la mayoría de las orquídeas (Arditti, 1992). Cabe mencionar que el crecimiento del embrión solamente ocurre después de que la semilla ha sido infectada por el hongo, el proceso de germinación se inicia con la absorción de agua por el embrión, este se hincha y ensancha, sus células se alargan, se vacuolan por lo que el embrión asume una forma esférica (etapa de esférica pequeña), posteriormente estas células hacen presión constante con la testa la cual se estira y finalmente se rompe. Las células del embrión sintetizan clorofila, especialmente en la región micropilar, se utiliza el material alimenticio de la semilla y se inicia el crecimiento, se absorbe la materia orgánica del sustrato y se diferencian los órganos, se desarrollan pelos absorbentes a partir de la epidermis, a su vez se desarrolla una pequeña papila hacia la base (Shushan, 1959). Conforme esta estructura aumenta en tamaño se forma una masa globular de células (protocormo) con una depresión en su superficie superior. El primordio foliar emerge a partir de esta depresión conforme el protocormo continúa su desarrollo. Una segunda y una tercera hoja se forman precedidas por el desarrollo de la raíz,

se forma clorofila en las hojas o en otros órganos fotosintéticos y por último la planta madura y se desarrolla una inflorescencia. El tiempo requerido para cada uno de estos eventos varía de acuerdo a las especies (Arditti, 1982; Baker *et al.*, 1987).

GERMINACIÓN SIMBIÓTICA DE ORQUÍDEAS

Cuando las primeras semillas de orquídeas germinan, y antes de que todos los patrones del metabolismo puedan desarrollarse completamente y funcionar, el crecimiento y/o la diferenciación de las plántulas puede estar limitada verdaderamente por la falta o carencia de un componente en particular, los experimentos han dado indicios del papel que tienen los carbohidratos en la fisiología de las orquídeas (Withner, 1974).

Los primeros estadios de germinación, que corresponden a la degradación de los materiales de reserva de naturaleza lipídica del embrión y a la aparición de almidón dentro de las células básicas del protocormo, se efectúan espontáneamente, más la progresión ulterior y la germinación de las semillas depende de la presencia de un hongo simbiótico en la naturaleza, el cual aparentemente es del género *Rhizoctonia*, por lo tanto la presencia del hongo es esencial para la germinación de los embriones, ya que provee a las semillas de azúcares simples y por lo tanto estas pueden pasar a la etapa de protocormo, que es un órgano intermediario entre el procormo y la plántula (Leroux *et al.*, 1995).

El papel del hongo en la germinación de las orquídeas no fue apreciado hasta 1899, cuando Noel Bernard descubrió su importancia. En 1903, trató de germinar semillas de orquídea. Tanto él, como Burgeff en 1909 (citados por Arditti, 1992) concluyeron que un hongo específico era necesario para la germinación de las semillas de orquídea. Después de este descubrimiento, se utilizó el concepto de germinación simbiótica y varios investigadores utilizaron cultivos puros del hongo para cultivar semillas *in vitro* (Arditti, 1992).

Entre 1849 y 1921, únicamente se conocía el método simbiótico no *in vitro* para la germinación de las semillas.

A principios de 1920, Knudson demostró que el hongo estaba convirtiendo el almidón en azúcar y que las semillas la utilizaban para la germinación (Martínez, 1981).

Han existido muchas controversias, sobre la especificidad de la relación orquídea-hongo. Algunos autores específicamente de Knudson (1922) y Curtis (1939) (citados por Dressler, 1981), sostuvieron que esa relación no es específica y que la simbiosis puede

formarse con diferentes hongos, y que éste es un parásito no necesario para el crecimiento de la orquídea.

Estudios más recientes demuestran que cuando las semillas encuentran las condiciones adecuadas tanto abióticas (luz, temperatura, humedad) como bióticas (relación simbiótica), pueden germinar. Así mismo, el hongo no sólo es importante para la germinación sino también lo es durante el crecimiento de las plántulas, juveniles e individuos adultos, debido al intercambio de sustancias (Handley y Pegg, 1989). En las orquídeas las hifas no forman una capa conspicua en torno a la raíz, sino que invaden las células de esta. Estos hongos obtienen compuestos orgánicos a partir de las plantas asociadas y suministran minerales, agua y azúcares sencillos aprovechables por las orquídeas (Scagel *et al.*, 1987). El hongo ayuda a mantener un rango favorable de acidez para las semillas de las orquídeas y permite el desarrollo de plántulas con un suministro principalmente de carbohidratos (Withner, 1959).

La germinación de las semillas en orquídeas en condiciones naturales es un proceso extremadamente lento, ya que al carecer de tejido de reserva se vuelve dependiente del hongo, el contacto con este, ocasiona la estimulación necesaria para la germinación (Abraham y Vatsala, 1981). El papel principal del hongo es nutrir al embrión hasta que la plántula sea capaz de fotosintetizar carbohidratos (Leroux *et al.*, 1995).

El contacto con el hongo provoca la infección de las semillas, normalmente está ocurre a través de las células del suspensor, el contacto inicial entre el hongo simbiote y las semillas se ha observado que es al azar, ya que hasta la fecha no hay evidencias de un exudado o sustancia similar que sea producida por las semillas de orquídeas para que el hongo se adhiera. En la secuencia de la germinación, las hifas del hongo primero penetran en la cubierta de la semilla por medio de los microporos de la testa. Una vez dentro de la testa, las hifas son atraídas a la región del suspensor, donde una o más hifas penetran en las paredes de las células. Estas hifas se expanden a través de las células del suspensor y penetran las paredes de las células corticales adyacentes. Posterior a la infección del córtex, las hifas fúngicas se ramifican por todo el citoplasma y forman haustorios. La presencia de haustorios en un embrión es la primera indicación de una compatibilidad hongo/orquídea y que la germinación ha comenzado. Inmediatamente después de la formación de los

haustorios en las células corticales, las células meristemáticas empiezan a dividirse y crecer. La estructura resultante recibe el nombre de protocormo. Algunas de sus células epidérmicas comienzan a elongarse y sobresalen protuberancias que originarán rizoides del cuerpo del protocormo. El protocormo continua aumentando en tamaño, antes de la emergencia de la primera hoja de su ápice y posteriormente se desarrolla la primera raíz. Los protocormos de muchas especies epífitas contienen clorofila (Clements, 1988)

Durante el desarrollo del protocormo, al continuar la germinación, nuevos tipos de células aparecen: Células internas, más pequeñas que las del córtex, se desarrollan y forman una capa entre la epidermis y éste, al desarrollarse completamente, éstas células nuevas, que forman el cortex más externo, son invadidas por las hifas iniciales del mismo. Externamente, los rizoides se desarrollan a partir de la epidermis y pueden reconocerse como células elongadas individuales y, después como estructuras multicelulares más complejas. Las hifas que se originan del cortex externo infectan estos rizoides hasta el ápice de cada uno (Clements, 1988)

GERMINACIÓN ASIMBIÓTICA *in vitro*

Las semillas de orquídeas al no poseer cotiledón ni endospermo son heterótrofas y por lo tanto incapaces de efectuar la gluconeogénesis para transformar los lípidos en azúcares. Esto explica la necesidad, de porque las semillas de orquídeas necesitan de un suplemento externo de carbohidratos para continuar su diferenciación y crecimiento. Por lo que al suplementarle una fuente externa de azúcares a las semillas se estimula en los protocormos la organogénesis (Leroux *et al.*, 1995)

Knudson (1922) entre otros, investigó los factores que influyen en la germinación de las semillas en el laboratorio empleando métodos asimbióticos (citado por Baker *et al.*, 1987 y Arditti, 1992).

El desarrollo de métodos de germinación asimbiótica, para las semillas de orquídeas, captó la atención de los investigadores al realizar experimentos para demostrar que la función principal del hongo es proveer a estas semillas una fuente de carbono. La adición de azúcar y soluciones minerales utilizadas en el medio de cultivo por el profesor Pfeffer (1845-1920), sirvieron de base para desarrollar otros medios tales como el Knudson B, Knudson C y el Vacin y Went, entre otros. Algunos de ellos son útiles para ciertos géneros y especies

que tienen requerimientos especiales, mientras que otros son formulaciones simplificadas, los cuales son convenientes para la mayoría de las orquídeas (Arditti, 1992)

Utilizando un medio basal adecuado, la germinación asimbiótica *in vitro* acorta el tiempo de germinación en las semillas, en condiciones naturales algunas especies requieren de tres a seis meses para germinar y más de seis meses para el desarrollo de las plántulas, sin embargo en condiciones *in vitro* el embrión de la semilla se hinchan aproximadamente después de los 18 días y empiezan a germinar aproximadamente después de 36 días en cultivo. Después de cuatro meses de la germinación, algunos protocormos pueden presentar cerca de 10 brotes y 30 raíces, después de seis meses se desarrollan plántulas completas (Hoshi *et al.*, 1994)

Los investigadores en el área mediante la germinación asimbiótica de las semillas, el crecimiento de los protocormos y plántulas *in vitro*, han sido capaces de mejorar la tasa de sobrevivencia por encima de la que prevalece en la naturaleza, obteniéndose miles de plántulas a partir de una sola cápsula (Penningsfeld, 1985)

La investigación básica en la germinación asimbiótica *in vitro* es importante, ya que, la germinación simbiótica de una especie rara o en peligro de extinción puede ser muy difícil o en algunos casos imposible, debido a la dificultad de descubrir, aislar e identificar a los hongos simbioses específicos (Clements 1988, Muir, 1987, Chu y Mudge, 1994)

DESARROLLO DE PLÁNTULAS

Las plantas de las orquídeas, de la misma manera que otras plantas con flores, deben alcanzar la madurez antes de que puedan florecer. Sin embargo, la información relacionada a la duración y fisiología de la juvenilidad en orquídeas es escasa (Goh y Arditti, 1985). El conocimiento del crecimiento y desarrollo de la orquídea es crucial para cualquier mejoramiento realizado y para optimizar su productividad (Hew y Yong, 1994)

El proceso de desarrollo, aunque con algunas diferencias, es similar entre la mayoría de las orquídeas, por tal motivo, al no encontrar trabajos que nos mencionen como ocurre el desarrollo en *Laelia speciosa* se recurrió al trabajo realizado por Shushan (1959), quien describe el desarrollo y crecimiento de las plántulas de *Cattleya* x *Trimos*, la autora encuentra que entre los cuatro y seis meses, éstas se han desarrollado completamente, es decir, con hojas y raíces. Una plántula con 5 hojas tiene 2 raíces visibles y al final de los 12

meses las plántulas miden cerca de 1 a 2 centímetros de alto, con 6 a 7 hojas y 3 a 4 raíces. Después de doce meses de cultivo, las plántulas que tienen una altura de 0.5 cm a 2 cm de altura se transfieren del cultivo *in vitro* a macetas que contengan musgo, las plántulas se mantienen en el sustrato de 14-16 meses.

Durante este tiempo las plántulas tienen un desarrollo variado, una plántula que tiene 22 meses de edad crece de 0.7 a 8 cm, tienen de 6 a 9 hojas, en algunos casos una rama ya es evidente, las plantas exhiben un crecimiento vigoroso, su talla se incrementa de 5 a 10 cm y su primera rama mide de 4.5 a 17 cm, esto permite que las plantas se transplanten individualmente en macetas. A los 4 años de edad la planta está constituida de 4-5 ramas, a los 4 $\frac{1}{2}$ ó 5 años la altura de las ramas es de 15-24 cm y los pseudobulbos miden de 4-5 cm. En cada rama sucede un crecimiento terminal determinado y es aquí donde se inicia la producción de flores. Los pseudobulbos incrementan su talla y surgen las raíces adventicias aéreas de los nudos basales de cada rama. A los 5 años de edad la planta se transfiere a una maceta de 4 $\frac{1}{2}$ pulgadas y las ramas adicionales alcanzan una altura de 35 cm y los pseudobulbos miden aproximadamente 17 cm; a esta edad es ya seguro que se da la producción de flores.

Después de la floración una rama madura permanece cerca de 5 años, por este tiempo la fotosíntesis de las hojas se detiene, se vuelven amarillas y caen, el tallo finalmente se marchita. De esta manera, si cualquiera de las ramas produce dos nuevas ramas, pueden separarse dos nuevas plantas cuando la rama original decaiga y muera. Las plantas entonces muestran un método vegetativo de reproducción.

EFECTO DE CARBOHIDRATOS EN ORQUÍDEAS

Los estudios sobre el efecto de carbohidratos en la Familia Orchidaceae han recibido limitada atención, a pesar de que, las investigaciones iniciales se remontan aproximadamente hacia el siglo XVII.

Jonh Lindley, supuso que el "salep" (una preparación de suelo hecha con tubérculos de *Orchis maculata*) de *O. maculata* contenía cantidades substanciales de almidón. En 1844, Schmidt aisló un azúcar fermentable, que identificó como glucosa y que además la incluyó en el grupo de los carbohidratos (citados por Arditti y Ernst, 1984).

Knudson (1916) (citado por Martínez, 1981), demostró que la nutrición orgánica de las plantas estaba influenciada por azúcares, los cuales a su vez determinan el crecimiento; sugirió que la germinación de semillas de orquídeas podría ser obtenida con el uso de ciertos azúcares

Knudson (1921, 1922) (citado por Arditti, 1982) realizó una investigación partiendo del hecho de que las micorrizas proveen a las orquídeas de azúcares solubles, que en concentraciones adecuadas, no están disponibles naturalmente para las plántulas de orquídeas, ya que en el suelo, se establece una competencia entre los organismos

Knudson fue el primero en cultivar raíces en forma aséptica, esto le permitió investigar la secreción y el metabolismo de los carbohidratos, tales estudios lo condujeron a la realización de experimentos de germinación asimbiótica de semillas de orquídeas *in vitro* (Ernst y Rodríguez, 1984)

En 1930, Quednow (citado por Arditti, 1982) reportó que la D-galactosa es altamente tóxica para las orquídeas, pues este carbohidrato contiene oligosacáridos que inhiben la germinación de la semilla y el desarrollo de las plantas en proporción directa a la cantidad acumulada de galactosa en el medio de cultivo

Burgell (1936) y Thomale (1954) (citados por Withner, 1959) insistieron en que la combinación de glucosa y fructosa fue necesaria para la germinación del género *Paphopedilum* y otras orquídeas terrestres. De 1970-1971, Ernst estableció evidencias de que las raíces de las plántulas producen la invertasa extracelular que hidroliza la sacarosa, la glucosa y la fructosa. Se encontró que la galactosa es la causante del rompimiento de la membrana vacuolar y anomalías de la cromatina citado por Ernst y Rodríguez (1984), del mismo modo Withner (1974) reporta efectos tóxicos de la galactosa, sobre plántulas jóvenes.

Los carbohidratos naturales son una fuente para la nutrición de plántulas de orquídeas; se ha confirmado que solamente las series D-azúcares son útiles durante la germinación, particularmente la fructosa, y también la xilosa. Withner (1974), observó que los carbohidratos preferidos por varias epífitas son en el orden siguiente: glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, manitol, galactosa y lactosa.

Las micorrizas de orquídeas transportan los carbohidratos de manera inversa a otro tipo de micorrizas, según Smith (1969) (citado por Dijk, 1989), menciona que los azúcares son transportados desde el hongo hacia la orquídea hasta el estado de protocormo; en etapas posteriores de desarrollo el transporte puede cesar. Clements (1988) reportó que cuando la orquídea se encuentra en estado de protocormo la hifa penetra en los filamentos epidérmicos desde las células corticales adyacentes y crece dentro del sustrato.

Yates y Curtis en 1949 (citados por Withner, 1959), estudiaron el efecto de la sacarosa en la diferenciación de raíces y brotes de plántulas de epífitas, encontraron que a altas concentraciones de sacarosa (34 2-51 3 g/l) existe un crecimiento óptimo de la raíz. Sugirieron que la relación brote-raíz es una respuesta directa de la concentración del azúcar en la planta y que otros factores afectan esta relación a través del metabolismo del carbohidrato.

La sacarosa es probablemente el carbohidrato más ampliamente usado en cultivo de tejidos vegetales; ya que reportes anteriores han confirmado que la sacarosa es una fuente aceptable de carbón, característica que también ha sido reportada para maltosa y xelobiosa. Según Millán y Davidson (1992), estos carbohidratos son capaces de mantener y promover el crecimiento y desarrollo morfogénico de ciertas líneas celulares. Withner (1959) reporta que la sacarosa se ha empleado para la diferenciación de raíces y brotes de semillas de orquídeas epífitas.

EFECTO DE CARBOHIDRATOS EN *Laelia*

Existe un número reducido de investigaciones sobre el efecto de carbohidratos durante la germinación y desarrollo en el género *Laelia*. Arditti en 1992 cita que los primeros reportes corresponden a Bernard (1909), relacionados con la capacidad de germinación de esta orquídea utilizando sacarosa y a Knudson (1922), quien obtiene la germinación asimbiótica de semillas de un híbrido de *Laelia-Cattleya*, con la utilización de azúcares (glucosa y fructosa) en un medio nutritivo con sales minerales y extracto orgánico. No es sino hasta después de cincuenta y siete años, cuando Ichihashi (1979), reporta el estudio de la germinación y crecimiento en la especie *Laelia anceps*, con el efecto de diferentes medios nutritivos suplementados con 2% de sacarosa. En el cual menciona que los

protocormos desarrollaron hojas a las nueve semanas de cultivo, obteniéndose aproximadamente un 50% de germinación

Lee y colaboradores (1982) llevan a cabo el estudio sobre el efecto de sacarosa en semillas de *Laelia briegei* en diferentes medios nutritivos mencionando que el crecimiento óptimo de las plántulas resultó ser con 3 y 4% de sacarosa

Luna y Cosmes (1989) reportan el desarrollo ontogénico del embrión de *L. speciosa* utilizando dos medios nutritivos suplementados con diferentes concentraciones de sacarosa, obteniendo un mejor desarrollo al utilizar 1 5% de sacarosa

Valencia (1992) reporta que el mayor crecimiento de los órganos vegetales de *Laelia speciosa* se obtienen en el medio Murashige y Skoog adicionado con sacarosa a una concentración de 75 g/l

Stancato y Fania (1996) realizaron un experimento con plantulas de *Laelia cinnabarina* para observar el efecto de varios medios nutritivos suplementados con 20 g/l de sacarosa y especularon que posiblemente *Laelia cinnabarina* muestra una correlación entre la acumulación de peso seco y la disponibilidad de nutrientes *in vitro*

ASPECTOS GENERALES DE LAS ORQUÍDEAS

El número de especies por las cuales esta conformada la familia de las orquídeas, fluctua entre 17,000 y 35,000 especies de distribución cosmopolita, el auténtico total posiblemente nunca se sepa pero Hernandez (1992) estima éste número en 35,000 especies. Muchos autores Marden (1990), Strasburger y colaboradores (1988) y Weier y colaboradores (1983) consideran a este grupo como el más avanzado de las monocotiledóneas, pues presenta grandes adaptaciones morfológicas, tales como formación de polinios, diferenciación tardía de óvulos, reducción del gametofito femenino, y diferentes formas de polembrionia

Se trata de plantas herbáceas terrestres, con mayor frecuencia epifitas, se distribuyen principalmente en los trópicos, con algunos géneros existentes en zonas templadas y frías (Strasburger *et al.*, 1988) Presenta dos diferentes hábitos de crecimiento, el simpodial y el monopodial, el primero se caracteriza por presentar un tallo o pseudobulbo de crecimiento definido, de la base del cual se origina un nuevo tallo, el monopodial presenta un tallo de crecimiento indefinido (Caneva, 1978) Los tallos; tienen de una a muchas hojas, las cuales

son simples, paralelinervas, sésiles, alargadas, radicales o terminales, solitarias o en grupo; generalmente de color verde (Caneva, 1978).

Las flores por lo regular son epiginas, con simetría bilateral (Weberling, 1987), su tamaño varía de pocos milímetros a 25.5 cm de diámetro (Orquideas, 1980) bi o tricolores, fragantes o inodoras. El perigonio está integrado por dos verticilos, el verticilo interno se ha transformado en un labelo (Weier *et al.*, 1983), que va desde la superficie estigmática hasta el ovario; se caracteriza por presentar una consistencia cerosa. El polen se encuentra limitado por masas largas llamadas polinios, los cuales se adhieren al agente polinizador el cual los retirade la flor (Larson, 1988).

De los estambres, sólo son fértiles los dos laterales del verticilo interno, algunos pueden quedar en forma de estaminodios (estructuras no fértiles similares a estambres), cada saco polínico o media antera posee formaciones accesorias, como el pedicelo y el rostelo (Weier *et al.*, 1983), éste último está situado en el envés de la columna, entre el casco de la antera y la superficie estigmática. Es una glándula formada en la punta del estilo y aparece como una proyección puntiaguda entre el estigma y el casco de la antera (Larson, 1988).

El fruto es una cápsula dehiscente con muchas semillas diminutas, el cual deriva de un ovario infero, tricarpelar, generalmente unifocular, con una placentación parietal, el fruto está dividido abajo de la línea media de cada carpelo, las valvas están conectadas por fibras transversales (Dressler, 1981).

Las semillas pesan entre 0.3 y 6.3 microgramos, miden entre 200 y 560 micras de largo por 80 a 129 micras de ancho (Arditti, 1992). Consisten de un embrión indiferenciado (sin cotiledón, ni endospermo), diminuto y elipsoide, unido a una membrana delgada llamada testa, por medio de varias fibras celulares, rodeado por un gran espacio de aire interior (Arditti, 1967).

ASPECTOS GENERALES DE LA ESPECIE *Laelia speciosa* (H.B.K.) SCHLTR.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

L. speciosa es considerada como una de las plantas más bellas de su género, además de que representa a la especie tipo del género al que pertenece. Las plantas son epifitas perennes pequeñas de afinidad xerófila. Sus órganos de perennación son los pseudobulbos,

éstos, se caracterizan por ser homoblásticos, subglobosos a ovoides (de aproximadamente 6 cm de largo y 0.3-5 cm de diámetro), estrechamente agrupados.

Presentan una o raramente dos hojas terminales, lanceoladas, suculentas, coriáceas, de 0.5-25 cm de longitud y 0.3-5 cm de ancho

La inflorescencia es de tipo terminal (de 12 a 20 cm), expone de 1 a 2 flores que miden 10-15 cm de diámetro, de color rosa-lila, claro hasta oscuro. Los sépalos son lanceolados y los pétalos son del doble de ancho, el labelo es blanco y se halla en el centro con líneas rojas; el lóbulo medio del labelo es casi redondo de color rosa-lila, en los bordes. Cuando la flor es polinizada se constituye un fruto elipsoide

El hábito de crecimiento es simpodial, compuesto por una sucesión de brotes similares (pseudobulbos), los cuales se dividen en una región basal-rizomatosa y una erecta. La primera región es de crecimiento mientras que la segunda es un tallo suculento engrosado (figura 1). El período de floración abarca de mayo a junio (Hernández, 1992, Halbinger, 1993)

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Laelia speciosa es una de las primeras orquídeas mexicanas citadas en la literatura científica. En México, es conocida comúnmente con los nombres de "flor de mayo", "flor grande", "Tlacuochitl", "Deantaza", "Itzamahua" y "Chichiltictepetzacuochitl" (Hernández, 1992, Halbinger, 1993)

Karl S. Kunth, colaborador del Barón Alexander Von Humboldt, en 1815, describió a la planta como *Bletia speciosa*. En tanto que los botánicos mexicanos Pablo de la Llave y Juan Lexarza, la describieron como *Bletia grandiflora* en 1825, y J. Lindley la describió como *Laelia majalis*. Actualmente, esta orquídea es conocida como *Laelia speciosa*, cuyo nombre se debe a Rudolf Schlechter en 1914, (Halbinger, 1993)

La sistemática del género *Laelia* ha sido revisada por Schlechter y entre muchas es la clasificación más importante, aunque en la actualidad esta no es muy aceptada. Schlechter, ubica a las especies de México y Centroamérica en tres secciones.

- 1) Calolaelia, con *Laelia superbiens*.
- 2) [Eu]Laelia, con *Laelia speciosa*.

3) Podolaelia, con siete especies: *L. albida*, *L. anceps*, *L. autumnalis*, *L. furfuracea*, *L. gouldiana*, *L. peduncularis* y *L. rubescens* (Halbinger, 1993).

Cronquist (1981) y Dressler (1993) proponen la siguiente clasificación taxonómica para la especie *Laelia speciosa*:

Reino: Vegetal

División: Spermatophyta

Subdivisión: Angiospermae

Clase: Liliopsida

Subclase: Liliidae

Orden: Orchidales

Familia: Orchidaceae

Subfamilia: Epidendroideae

Tribu: Epidendreae

subtribu: Laeliinae

Género: *Laelia*

Especie: *Laelia speciosa* H.B.K. Schltr.

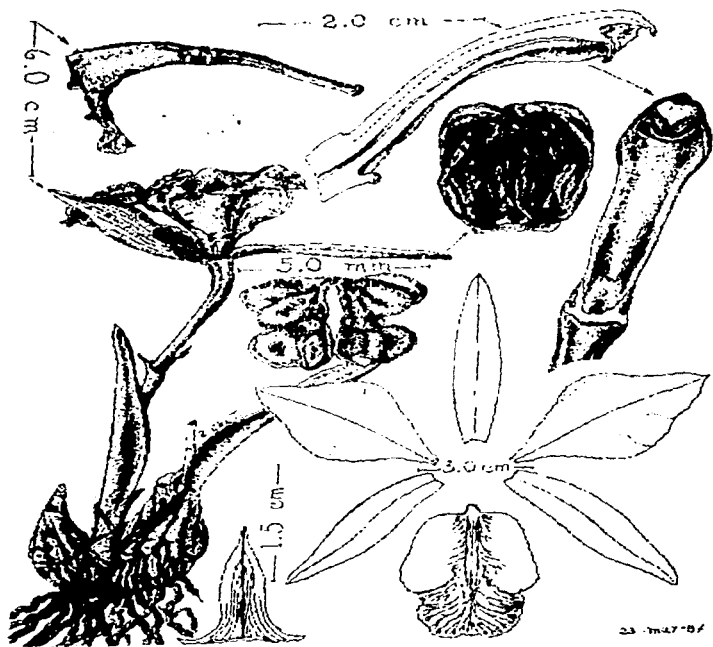


Figura 1. Planta completa de *Laelia speciosa* mostrando raíz, pseudobulbo y flor (tomado de Halbinger, 1993)

MATERIAL Y MÉTODO

RECOLECTA Y ALMACENAMIENTO DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron semillas de *Laelia speciosa* contenidas en cápsulas de aproximadamente 10 meses de edad colectadas en una comunidad de pino-encino ubicada en Coenembo, Michoacán. Para el almacenamiento de los frutos se siguió el método propuesto por Oliva y Arditti (1984), éstos se colocaron dentro de una bolsa de plástico, perfectamente cerrada y etiquetada. Una vez en el laboratorio las cápsulas se mantuvieron en un desecador con cloruro de calcio anhidro como agente desecante y se almacenaron en el refrigerador a una temperatura de 4° C.

Cuando se requirió el uso de semillas se recurrió al método propuesto por Arditti y Ernst (1993), el desecador se sacó del refrigerador y se dejó de dos a tres horas para que alcanzara la temperatura del ambiente, evitando que el agua del aire se condensara sobre las semillas y, así eliminar la posibilidad de contaminación por hongos y/o bacterias.

SEMILLAS

Prueba de Viabilidad

Para realizar la prueba de viabilidad se utilizaron semillas de dos frutos, de cada uno se tomaron 4 muestras de 100 semillas, y cada muestra se colocó en un sobre de papel filtro de 2x2 cm y se aseguró con una pinza metálica. Posteriormente, se colocó en un vaso de precipitado, agregando una solución de hipoclorito de sodio comercial (Clorox) al 6% v/v (0.6% de cloro activo, esto es 10 ml de éste clorox comercial diluidos en 100 ml de agua destilada) durante 5 minutos, pasado este tiempo se decantó esta solución y las semillas se enjuagaron dos veces con agua destilada, después se remojaron en una solución de 2,3,5 trifenil-tetrazolio (TTC) al 1% p/v durante 24 horas en la obscuridad; las semillas se cubrieron totalmente con esta solución para que la exposición al colorante fuera uniforme.

Después de este tiempo se decantó la solución y se abrieron los sobres para observar, con la ayuda de un microscopio estereoscópico, las semillas coloreadas (viables) y no coloreadas (no viables) (Moreno, 1984)

Morfometría

La determinación morfométrica de las semillas se realizó al tomar ocho muestras de semillas de cada uno de los frutos empleados en la prueba de viabilidad y fueron sometidas a dos tratamientos, utilizando el método propuesto por Waes y Debergh (1986).

El primero consistió en colocar dos muestras de semillas de cada uno de los frutos en un vidrio de reloj, agregándoles una solución de hipoclorito de sodio comercial (Clorox) al 6% v/v, dejándolas en esta solución durante 5 minutos, posteriormente se realizaron tres enjuagues con agua destilada para luego agregarles unas gotas de Verde Malaquita al 0.01% p/v, manteniéndolas en exposición a éste durante 10 y 15 minutos cada una de las muestras, pasado este tiempo se decantó el colorante y las semillas se depositaron en un portaobjetos, agregándoles unas gotas de glicerol para eliminar el exceso de colorante.

En el segundo tratamiento se siguió el procedimiento anterior, exceptuando la exposición de las semillas a la solución de hipoclorito de sodio, es decir, se agregó directamente el colorante.

Una vez realizados los tratamientos, se observaron 90 semillas (de cada muestra) y se hicieron medidas del largo y ancho de las semillas y del embrión con la ayuda de un fotomicroscopio estereoscópico, previamente calibrado con un micrómetro y equipado con una lentilla graduada, para calcular el factor de calibración (cuyo valor fue de 0.05128), dicha calibración se realizó a 30 aumentos, al igual que las mediciones correspondientes para realizar las mediciones del contorno del embrión y las semillas. Se calculó el tamaño promedio del embrión y de las semillas de *Laelia speciosa*.

MEDIO DE CULTIVO

El medio nutritivo que se empleó fue el Murashige-Skoog (MS), el cual se maneja en dos modalidades:

- 1.- Preparado con reactivos analíticos en el laboratorio.
- 2 - Una mezcla comercial de sales básicas marca Sigma.

Ambos se suplementaron con sustancias orgánicas y agar como agente gelificante (Cuadro I del anexo).

El pH del medio se ajustó a 5.7, con la ayuda de un potenciómetro digital, utilizando soluciones 1N de HCl o de NaOH según se requiriera (Manzanares, 1987). Una vez preparado el medio de cultivo se vaciaron 15 ml en tubos de ensaye, los que se esterilizaron en autoclave a una temperatura de 121°C y a una atmósfera de presión durante 15 minutos; que es el método propuesto por (Han y Stephens, 1992; Leifert *et al.*, 1992).

PRUEBA DE DESINFESTACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Para la desinfestación se tomó una muestra al azar de semillas de *Laelia speciosa* y se colocó en sobres de papel filtro de 2x2 cm, los que se aseguraron con una pinza metálica, posteriormente, los sobres se colocaron en un vaso de precipitado que contenía una solución de etanol al 70%, durante un lapso de 10 minutos para posteriormente decantar, después se le agregó a las semillas una solución de hipoclorito de sodio comercial (Clorox) al 6.0% v/v % como agente desinfectante adicionándole detergente al 0.05% p/v para romper la tensión superficial, este método es el propuesto por Manzanares (1987), las semillas se dejaron en ésta solución a diferentes tiempos de exposición (5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos), cada tratamiento con tres repeticiones, posteriormente se decantó y se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril

Pasado el tiempo de exposición al desinfectante y el de los testigos (tratados con agua destilada) los sobres que contenían las semillas se sembraron en tubos con el medio MS comercial, adicionado con 30 g/l de sacarosa y 10 g/l de Agar Bioxón bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar, cuidando que las semillas quedaran al descubierto y cerciorándose de que el papel estuviera en contacto con el medio (Arditti, 1990; Larson, 1988). Los tubos fueron sellados con papel plástico autoadherente y al tercer día de efectuada la siembra se registró la contaminación producida por hongos y/o bacterias señalando el lugar en el que se presenta.

SIEMBRA

Antes de realizar la siembra, el material biológico se desinfectó, y cristalería e instrumental se esterilizaron, todas las superficies de la campana de flujo laminar se limpiaron perfectamente con una solución de etanol al 70% y se encendieron dos mecheros

Bunsen para brindar un área totalmente aséptica Posteriormente se colocaron en dicha área todos aquellos materiales que se requirieron para realizar la siembra (frascos, tubos, cajas de Petri, paquetes de semillas, pinzas de punta roma)

Cada sobre con semillas se sujetó con la ayuda de dos pinzas previamente esterilizadas (flameadas con etanol y frías) y se les retiró la pinza metálica para colocarlo dentro del tubo de ensayo sobre el medio de cultivo, cuidando que las semillas quedaran al descubierto y cerciorándose de que el papel estuviera en contacto con el medio (Arditti, 1990; Larson, 1988)

CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Durante la fase de incubación, se utilizó el método sugerido por Koleff (1988); el cual consiste en llevar los tubos de ensayo a una sala de incubación con luz blanca y fluorescente con una intensidad luminosa de 4670 Lux (4 focos de 75 W) y se mantuvo un fotoperíodo de 16 horas de luz por 8 de oscuridad a una temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$.

GERMINACIÓN

i) Efecto de la Exposición al Desinfectante

Los tratamientos empleados en la prueba de desinfectación que no presentaron contaminación se mantuvieron en cultivo y a los 14 días se evaluó el porcentaje de germinación (semillas hinchadas, amarillas y verdes) así como la viabilidad de las semillas de manera directa. A estos resultados se les aplicó un análisis de varianza (ANDEVA) unifactorial con un intervalo de confianza de 0.05% factor, para determinar el mejor tiempo de exposición al desinfectante

ii) Efecto de los Carbohidratos

Una segunda prueba de germinación consistió en sembrar semillas en el medio de cultivo MS preparado (Cuadro 1 del anexo) suplementado con diferentes tipos y concentraciones de carbohidratos (Cuadro 2 del anexo)

Para ello se tomaron 100 semillas con tres repeticiones para cada tratamiento y se colocaron en sobres de papel filtro asegurándolos con una pinza metálica, posteriormente se desinfectaron utilizando el mejor tiempo de desinfectación resultante en dicha prueba, se

decanó el desinfectante y se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril y se tomaron los sobres con unas pinzas previamente esterilizadas para retirar la pinza metálica; cada sobre se colocó en un tubo de ensayo con medio de cultivo.

Para la evaluación de esta prueba, se observó que las semillas tuvieran la siguiente apariencia: que estuvieran hinchadas amarillas y/o de color verde (proceso de imbibición de agua por las semillas), o incluso cuando ya se hubieran establecido como plántulas (constituidas por hojas verdaderas y con una a dos raíces)

El porcentaje de germinación se evaluó cada 7 días después de realizada la siembra hasta completar 63 días. A los resultados obtenidos se les aplicó un (ANDEVA) multifactorial, con un intervalo de confianza de 0.05%

INDICE DE DESARROLLO DURANTE LA GERMINACIÓN.

Para evaluar los estadios de desarrollo de las semillas durante la germinación se realizaron observaciones cada 7 días durante 63 días, iniciando a los siete días de realizada la siembra.

A los estadios de desarrollo del embrión, durante la germinación *in vitro*, se le asignó un valor correspondiente a cada fase de desarrollo (Cuadro 3 y figura 2 del anexo)

El Índice de desarrollo (I de D) se calculó para cada repetición, siguiendo el método sugerido por Pritchard (1989) el cual consiste en: multiplicar el número de semillas que se encontraban en una fase de desarrollo determinado, por cien y dividiendo entre el número total de semillas, este resultado se multiplicó por el valor correspondiente a dicha fase de desarrollo y se sumaron cada uno de los valores obtenidos para las diferentes fases; esto se hizo con la finalidad de seguir cuantitativamente el desarrollo normal de las semillas y por lo tanto los resultados pueden fácilmente sujetarse a un análisis de varianza.

Se realizó un ANDEVA multifactorial, con un intervalo de confianza de 0.05%, a los I. de D. de cada observación para determinar el efecto del tipo y concentración del carbohidrato sobre el desarrollo del embrión durante el proceso de la germinación.

CRECIMIENTO Y DESARROLLO

Las plántulas obtenidas de la germinación asimbiótica, con al menos una raíz y hojas verdaderas, se emplearon para evaluar su crecimiento y desarrollo. Para esto se utilizaron las

dos modalidades del medio MS (cuadro 1 del anexo) y los tratamientos con carbohidratos (Cuadro 2 del anexo), se consideró una muestra aleatoria de 15 plántulas con una repetición (30 plántulas en total) para cada tratamiento

Después de los tres meses se evaluaron los siguientes parámetros: altura de la plántula, número de raíces, longitud de la raíz más larga y número de brotes

A los datos obtenidos se les aplicó un ANDEVA de factorial múltiple con un intervalo de confianza de 0.05%, para comparar la efectividad de los medios nutritivos (comercial y preparado), del tipo y concentración del carbohidrato sobre el crecimiento y desarrollo de las plántulas de *Laelia speciosa*.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

VIABILIDAD

Esta prueba permite estimar en una forma rápida la condición biológica de las semillas. Es también es útil para el análisis de semilla latente, así como para complementar los datos obtenidos en una prueba de germinación.

La prueba de viabilidad está basada en la actividad enzimática de la parte embrionaria de las semillas. Se puede demostrar mediante el uso del reactivo denominado tetrazolio (2,3,5 trifenil-tetrazolio) (TTC), este producto es un indicador de óxido-reducción que en contacto con el tejido vivo se reduce a un pigmento rojizo (Association of Official Seed Certifying Agencies Certification Handbook, 1971)

La actividad de los sistemas enzimáticos decrece paralelamente con la viabilidad de las semillas, por lo tanto una coloración rojo-intenso es indicadora de la presencia de células vivas del embrión. En cambio, la falta de coloración o coloración rosa-pálido son indicadoras de la muerte o poca viabilidad de las células embrionarias (Moreno, 1984)

En los resultados el fruto 1 presentó un porcentaje de viabilidad de 55% en tanto que el fruto 2 presentó un porcentaje de viabilidad de 76%, por lo que para las pruebas de desinfectación y germinación se utilizaron las semillas del fruto 2.

La viabilidad se evalúa como el porcentaje de semillas o embriones coloreados que reaccionan con el TTC. Las diferencias en el porcentaje de embriones teñidos se deben a las variaciones de permeabilidad que tienen las semillas. Después del remojo en agua, las semillas revestidas se vuelven permeables a los nutrientes y al agua (Waes y Deberg, 1986)

Se sabe que el hipoclorito elimina la suberina en los tegumentos y que la testa es degradada por alcalización y oxidación, de esta manera se incrementa la difusión y la permeabilidad por el agua. Trabajos preliminares, revelan que el TTC no puede ser aplicado directamente a las semillas, éstas deben de remojar en agua y posteriormente desinfectarse con hipoclorito de sodio; ya que esto permite una mayor permeabilidad de las semillas al colorante y por lo tanto aumenta el porcentaje de embriones teñidos. Por lo que se sugiere que las semillas permanezcan más tiempo en el agua, hipoclorito y posteriormente en el TTC. Kano en 1968 (citado por Hoshi *et al.*, 1994) comenta que la desinfectación en una

solución de NaClO por un largo periodo de tiempo ha demostrado que incrementa la germinación de semillas de orquídea

Por tal motivo *Laelia speciosa* al poseer semillas que tienen una testa que es poco permeable al agua (revestidas) las cuales se remojaron en agua y se trataron con hipoclorito con un buen periodo de tiempo, exhibió un alto porcentaje de embriones coloreados. El uso de un agente desinfectante y el TTC así como el mantener las semillas en este por 24 horas resultó efectivo para evaluar la viabilidad de las semillas de esta especie

Con respecto al tiempo de duración en el TTC existen reportes los cuales mencionan que el tiempo en éste no es un factor determinante en el porcentaje de embriones coloreados, St-Arnauld y colaboradores (1992) menciona que no hay una diferencia de viabilidad entre las 48 y 96 horas

Sin embargo, la prueba del tetrazolio no es infalible, ya que existen circunstancias en las que aparentemente las semillas viables no germinan (y esto se debe a que algunas semillas, como las de orquídeas presentan latencia), por lo que existe el método directo para medir la viabilidad de las semillas basado en el porcentaje de germinación (Waes y Debergh, 1986), además de que existen muchos otros factores que determinan el que una semilla sea viable o no, por ejemplo, Shoushtari (1994), encuentra que la viabilidad depende de la especie, la edad de esta y el tiempo de almacenaje y que los tiempos prolongados de almacenaje puede crear lesiones celulares, además de que esto determina el mantenimiento de la integridad celular y molecular (Osborne, 1980, Seaton y Hailes, 1989)

Aunque los resultados muestran que hay un alto porcentaje de viabilidad (76%), existen reportes, Waes y Debergh, (1986), Hoshi y colaboradores (1994), los cuales mencionan que las semillas de orquídeas son muy poco viables, y es por esto que no se desarrollan métodos de propagación de orquídeas debido a la poca viabilidad de las mismas.

MORFOMETRÍA DE LA SEMILLA Y EL EMBRIÓN

La morfometría de la semilla y el embrión puede aportar datos importantes para la ubicación taxonómica de una especie, aunque es importante remarcar que pueden ocurrir variaciones importantes en estas medidas a nivel de género y especie debido a las condiciones ambientales (Chase y Pippen, 1990).

Dressler (1993) engloba la estructura de las semillas del género *Laelia* dentro de las estructuras de las semillas del tipo *Epidendrum* o variantes en más géneros con el tipo *Pleurothallis*, como en la mayoría de las semillas de orquídea las del tipo *Epidendrum* son de oblongas a alargadas, como polvo, miden de 0.5-1.0 mm de longitud y generalmente son de color amarillo pálido. Las dimensiones de las semillas de *Laelia speciosa* caen dentro de los rangos establecidos por este autor, ya que en promedio las dimensiones de las semillas del fruto 1 y el fruto 2 fueron de 0.53 y 0.57 mm de largo y de 0.17 y 0.18 mm de ancho respectivamente (cuadro 1). Aunque Dressler no menciona características sobre el embrión, las medidas morfométricas del embrión de las semillas de dichos frutos fueron de 0.33 y 0.34 mm de largo y de 0.12 y 0.13 mm de ancho.

Cuadro 1. Tamaño Promedio de las Semillas de *Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr.

| MEDIA | SEMILLA | | EMBRIÓN | |
|---------|------------|------------|------------|------------|
| | Largo (mm) | Ancho (mm) | Largo (mm) | Ancho (mm) |
| FRUTO 1 | 0.5344 | 0.1658 | 0.3239 | 0.1156 |
| FRUTO 2 | 0.5783 | 0.1814 | 0.3418 | 0.1285 |

En general, esto coincide con varios autores (Arditti, 1967, 1992; Harrison y Arditti, 1978; Abraham y Vatsala, 1988; Strasburger *et al.*, 1988) en cuanto a que las semillas de esta especie son de una estructura muy simple, son pequeñísimas, la testa es ligera, transparente y reticulada, de color amarillo y esta ocupada por espacios de aire; y ya que las observaciones realizadas en este trabajo son de carácter externo se sugiere que para una información más detallada y completa se recurra a otro método más específico para realizar la observación ultraestructural tanto del embrión así como de las semillas de *Laelia speciosa*.

DESINFESTACIÓN

a) Efecto del tiempo de exposición al Desinfestante

Las semillas de las orquídeas, pueden ser contaminadas en la superficie por esporas de hongos o bacterias cuando se les expone a el aire atmosférico. Para la desinfestación de las semillas es necesario utilizar una técnica donde se emplee un buen agente desinfestante (Abraham y Vatsala, 1981).

Por consiguiente, la desinfección de las semillas disminuye el riesgo de contaminación por microorganismos, las semillas expuestas al hipoclorito no presentaron contaminación (cuadro 2), mientras que en las tratadas con agua destilada estéril hubo proliferación principalmente de hongos (cuadro 3)

Cuadro 2. Evaluación de la Desinfección de Semillas de *Laelia speciosa* (H. B. K.) Schltr., [Tratamiento con NaClO]

| Tiempo de exposición NaClO | HONGOS | | | BACTERIAS | | |
|----------------------------|--------|------|-----|-----------|------|-----|
| | S/P | S/MS | S/S | S/P | S/MS | S/S |
| 5* | - | - | - | - | - | - |
| 10* | - | - | - | - | - | - |
| 15* | - | - | - | - | - | - |
| 20* | - | - | - | - | - | - |
| 25* | - | - | - | - | - | - |
| 30* | - | - | - | - | - | - |

S/P (Contaminación sobre el papel)

S/MS (C sobre el medio de cultivo)

S/S (C sobre semillas)

(-) Contaminación ausente

El hipoclorito de sodio al 6 0% y el tiempo de exposición no parecen ser tóxicos para las semillas de *Laelia speciosa*. Los resultados muestran que el hipoclorito de sodio realmente es efectivo para la desinfección de las semillas.

Por lo tanto, es recomendable la utilización previa de un agente desinfectante para disminuir el riesgo de contaminación, ya que en los tratamientos donde se empleó éste no hubo presencia de hongos.

Cuadro 3. Evaluación de la Desinfección de Semillas de *Laelia speciosa* (H. B. K.) Schltr., Tratadas con H₂O Destilada Estéril (Testigo).

| Tiempo de exposición H ₂ O | HONGOS | | | BACTERIAS | | |
|---------------------------------------|--------|------|-----|-----------|------|-----|
| | S/P | S/MS | S/S | S/P | S/MS | S/S |
| 5* | + | - | + | - | - | - |
| 10* | + | - | - | - | - | - |
| 15* | + | - | - | - | - | - |
| 20* | + | - | - | - | - | - |
| 25* | + | - | - | - | - | - |
| 30* | + | - | - | - | - | - |

(+) Contaminación presente

(-) Contaminación ausente

Aunque algunos autores (Waes y Debergh, 1986) reportan que el exponer las semillas a altas concentraciones (6-10%) y durante tiempos prolongados (5-30 minutos) al hipoclorito de sodio daña la testa y el embrión de las semillas de orquídeas, sin embargo, los resultados de esta investigación muestran que para las semillas de *Laelia speciosa* no resulta tóxico y esto concuerda con varios autores (Yanagawa *et al.*, 1995, Tsutsui y Tomita, 1990; Ernst, 1967; Hoshi *et al.*, 1994; Anderson, 1991 y Zettler *et al.*, 1995), quienes han probado el hipoclorito de sodio como agente desinfectante para semillas de orquídeas a diferentes concentraciones que van desde 0.1 hasta 14%, a diferentes tiempos de exposición; sus resultados demuestran que no es tóxico y al contrario ayuda a que las semillas queden libres de agentes patógenos y por lo tanto se puedan utilizar para realizar una propagación exitosa de ésta especie.

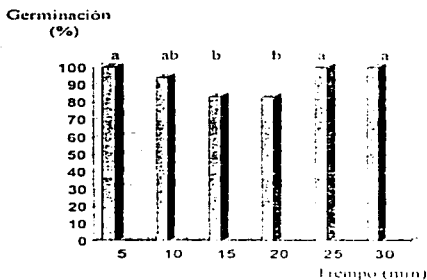
b) Efecto Sobre la Germinación

El análisis estadístico demuestra que en los tiempos de 5, 25 y 30 minutos la germinación de las semillas es mayor y diferente que en los tiempos de 15 y 20 minutos, sin embargo en el tiempo de 10 minutos la germinación de las semillas de *Laelia speciosa* expuestas a el desinfectante es igual a todas las concentraciones antes mencionadas (gráfica 1).

Aunque existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en la germinación a diferentes tiempos de exposición al desinfectante, se observa que en general, las semillas rebasan el 80% de germinación, esto sugiere que el agente desinfectante realmente ayuda a que se incremente la germinación en semillas de *Laelia speciosa* (gráfica 1), porque éste ocasiona que se elimine la suberina y que la testa se degrade por oxidación, de esta forma la difusión y la permeabilidad por el agua en las semillas se incrementa.

Por lo que se sugiere que se utilice un agente desinfectante para promover la germinación y que ésta se tome como una medida directa para calcular la viabilidad, ya que vemos que aunque en el fruto 2 se obtiene menos viabilidad (76%) hay mayor porcentaje de semillas germinadas (de 80 al 100%) lo cual es indicativo que el uso del TTC no es un método confiable para medir la viabilidad de las semillas de *Laelia speciosa*, por presentar inconveniencias, en semillas que tienen problemas de permeabilidad es muy difícil que éste penetre a través de la testa y por lo tanto la coloración del embrión es poca o nula.

GRÁFICA 1. GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE *LAELIA SPECIOSA* POR EFECTO DE LA DESINFESTACIÓN A LOS 14 DÍAS.



No existen diferencias significativas en los valores obtenidos con la misma letra ($p < 0.05$).

Las semillas que se cultivan en un medio nutritivo o esterilizadas con hipoclorito de sodio por largos periodos de tiempo aumentan su germinación (St-Arnauld *et al.*, 1992); también Lin y colaboradores (1994), mencionan que en semillas de *Bletilla formosana* pretratadas con peróxido de hidrógeno al 3% por 5 minutos aumentan su tasa de germinación por arriba de un 98%.

En los resultados se puede apreciar que al poner a remojar en agua y en una solución desinfectante las semillas revestidas de *Laelia speciosa* se vuelven permeables al agua y a otros nutrientes, y la presión osmótica generada por la concentración del medio puede modificar la permeabilidad de las semillas y por lo tanto aumentar el porcentaje de germinación en un medio que contiene nutrientes y sacarosa, comparado con el porcentaje que germina en su ambiente natural, ya que según Rao (1977) en la naturaleza solamente germina el 5% de todas las semillas provenientes de una cápsula, lo cual quiere decir que las diferentes concentraciones utilizadas en éste trabajo no tienen efectos tóxicos para las

semillas, pero esto no significa que en caso de una germinación pobre de las semillas estas no sean viables ya que ellas pueden verse afectadas por latencia (St-Arnauld *et al.*, 1992).

Rubluo y colaboradores (1989), Waes y Debergh (1986) mencionan que las diferencias en la madurez de las semillas, características intrínsecas de las especies, condiciones ambientales de cultivo y composición del medio de cultivo son algunos factores frecuentemente involucrados y que influyen el grado de éxito en los procesos de germinación de las semillas de orquídeas, o que simplemente ellas tienen un requerimiento mayor por otros factores

Las semillas pueden germinar asimbióticamente pero no siempre lo hacen, esto se debe quizá a las condiciones de almacenamiento, condiciones ecológicas así como a su grado de madurez o a la variación de las condiciones de cultivo (Anderson, 1991). Existen reportes, como el de Hoshi *et al.*, (1994) en el cual se reporta que las semillas de *Cypripedium japonicum* muestran relativamente un alto porcentaje de germinación (65.4%), pero por lo general hay una baja viabilidad y germinación en éstas y esto puede atribuirse al uso de semillas inmaduras (100 días de edad)

EFFECTO DE LOS CARBOHIDRATOS

1) Influencia del Tipo de Carbohidrato Sobre la Germinación

A los 7 días de iniciado el cultivo no hubo diferencias significativas ($p \geq 0.05$), estadísticamente en ninguno de los tres carbohidratos las semillas presentaron germinación (gráfica 2).

A los 14 y 21 días de cultivo, en la glucosa se alcanza entre un 89-91% resultando mayor y significativamente diferente a los porcentajes de germinación obtenidos en sacarosa y fructosa. Sin embargo, a partir de los 28 días y hasta los 63 días de cultivo los porcentajes de germinación obtenidos en glucosa y sacarosa son iguales estadísticamente, en ambos tipos de carbohidratos se alcanzó un 95% de germinación siendo mayores y diferentes estadísticamente a la fructosa en la cual sólo se llegó a un 85% (gráfica 2)

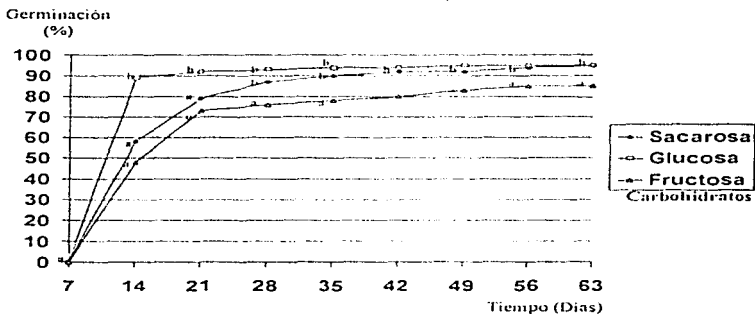
Estos resultados concuerdan con Arditti (1992), Levi y Sink (1992); Whitner (1974) quienes mencionan que en la sacarosa la tasa de germinación es más alta que en glucosa y

fructosa y en efecto esto se cumple en los resultados de esta investigación ya que a menor tiempo la glucosa promueve más la germinación y a mayor tiempo lo hace la sacarosa.

Se puede asegurar que la germinación ocurre con cualquier carbohidrato utilizado, pero existe una diferencia cuantitativa en la respuesta asociada con estos y su concentración; con el medio y algo muy importante es la especie con la cual se trabaja

Arditti (1992) reporta que la mayoría de especies de orquideas germinan y crecen mejor en fructosa y glucosa, lo que sugiere que tal vez a mayor tiempo de cultivo los 3 carbohidratos se comportarían igual estadísticamente, ya que al paso del tiempo la sacarosa

GRAFICA 2. INFLUENCIA DEL TIPO DE CARBOHIDRATO SOBRE LA GERMINACIÓN DE *Laelia speciosa*



No existen diferencias significativas en los valores marcados con la misma letra ($p=0.05$)

es estadísticamente igual a la glucosa, coincidiendo con Mezzetti y colaboradores (1991) quienes reportan que en el balance de los tres carbohidratos en el sistema medio-explante la utilización de estos continua en todo el periodo de cultivo

Se observa en general, que la germinación de *L. speciosa* obtenida en sacarosa, glucosa y fructosa a los 63 días en este estudio es alta (85-95%), comparada con el estudio que realizaron Zettler y McInnis (1993) en el cual reportan que las semillas de todos los

tratamientos de *Platanthera integrilabia* germinaron a los 50 días en un medio asimbiótico y obtuvieron una tasa de germinación alta (32.8 a 54.4%), pero esta tasa de germinación dependió del tiempo y del carbohidrato utilizado, lo cual nuevamente concuerda con nuestros resultados puesto que el alto porcentaje de germinación obtenida en *L. speciosa* dependió del carbohidrato utilizado así como de su concentración (gráfica 2).

La germinación de las semillas de *L. speciosa* se dio en un periodo corto (14 días) y como se mencionó anteriormente se obtuvo una germinación hasta los 63 días en los 3 carbohidratos, por arriba del 80%, sin embargo, en otras especies este proceso es más lento, para citar un ejemplo, los embriones de semillas de *Cypripedium acaule* de 60 días de edad empiezan a hincharse después de 18 días y después de 4 meses, el 15.3% de las semillas germinaron. La germinación de las semillas en un medio asimbiótico empezó después de 3 meses de cultivo y sólo el 3.4% germinaron después de los 6 meses (St-Arnaud *et al.*, 1992).

Aunque los tres tipos de carbohidratos están promoviendo la germinación de las semillas, con un solo carbohidrato, en este caso la sacarosa, se observa mayor y mejor estímulo para el embrión y se pueden alcanzar porcentajes de germinación hasta del 100%, lo cual concuerda con Hernández (1992) quien comenta que en campo, el porcentaje de germinación es muy bajo (4.8 y 2.2%) y en cambio en el laboratorio en condiciones *in vitro* el porcentaje de germinación es cercano al 100% (gráfica 2), pero esto no sugiere que la glucosa y la fructosa resulten tóxicos para las semillas, solo podemos asegurar que existe una respuesta diferente para cada carbohidrato y que, la sacarosa, glucosa y fructosa son excelentes fuente de energía para *Laelia speciosa*, los cuales promueven la germinación.

2) Influencia de la Concentración de los Carbohidratos Sobre la Germinación

A los 7 días de que se inició el cultivo, las semillas de *L. speciosa* permanecieron sin germinar (gráfica 3).

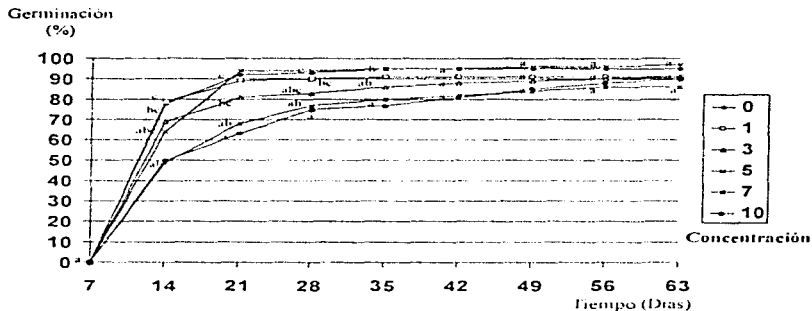
A partir de los 14 días de cultivo los porcentajes de germinación obtenidos en las concentraciones de 3 y 5% son iguales entre sí y diferentes a las demás concentraciones, mientras que en la concentración de 1% es mayor (79%) y significativamente diferente a las concentraciones de 7 y 10% (gráfica 3).

A los 21 días de cultivo el porcentaje de germinación obtenido en la concentración de 10% es igual a la de 7%, pero menor (63%) y estadísticamente diferente a las demás

concentraciones, mientras que en la concentración de 5% éste es mayor (94%) y estadísticamente diferente a las concentraciones de 7 y 10% (gráfica 3)

A los 28 días de cultivo el porcentaje de germinación obtenido en la concentración de 3% es estadísticamente igual que en todas las demás concentraciones, mientras que en la concentración de 5% éste porcentaje es mayor (94%) y estadísticamente diferente a todas las demás concentraciones (gráfica 3).

GRÁFICA 3. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS CARBOHIDRATOS SOBRE LA GERMINACIÓN DE *Lucilia speciosa*



No existen diferencias significativas en los valores marcados con la misma letra ($p > 0.05$)

A los 35 días de cultivo los porcentajes de germinación obtenidos en las concentraciones de 1 y 3% son iguales en todas las demás concentraciones, y en la concentración del 5% éste porcentaje aumenta (95%) y es diferente estadísticamente que el obtenidos en las concentraciones de 7 y 10% (gráfica 3)

A los 42 y hasta los 63 días de cultivo los porcentajes de germinación resultan ser iguales estadísticamente en todos los tratamientos; sin embargo, en las concentraciones de 7 y 10% se obtiene cerca del 90% de germinación y en concentraciones de 1, 3 y 5% se obtiene entre un 91 y 97% (gráfica 3)

Podemos observar que concentraciones altas y bajas de los carbohidratos no resultan ser tóxicas para la germinación de las semillas de *L. speciosa*.

A partir de los 21 días, siempre a concentración de 5% se obtiene el mayor porcentaje de germinación, sin embargo al paso del tiempo podemos ver que en todas las concentraciones los porcentajes de germinación son altos (gráfica 3).

Por lo que podemos estar seguros que con altas concentraciones de carbohidratos (7 y 10%) hay menor porcentaje de germinación y que a bajas concentraciones de éstos (1, 3 y 5%) existe mayor porcentaje de germinación y por consiguiente estas concentraciones estimulan la germinación de las semillas de *L. speciosa*, sin embargo se cita (Rubluo *et al.*, 1989) que altas concentraciones de sacarosa (4%) reducen la germinación en *Betula urbana* y que también existe un efecto osmótico con sacarosa y una reducción del crecimiento a altas concentraciones de este mismo carbohidrato al 5%.

Se puede observar, que las semillas de *L. speciosa* inician la germinación en poco tiempo (14 días) y que la tasa de germinación es alta (49 al 79%) (gráfica 3) comparada con otras especies, ya que como reportan Zettler y McInnis (1992) para las semillas de *Platanthera integrilabia*, las cuales germinaron a los 50 días en un medio asimbiótico y se obtuvo una tasa de germinación alta (32.8 a 54.4%), pero ésta dependió del tiempo y del carbohidrato utilizado.

Sin embargo, hay especies las cuales sus semillas germinan en corto tiempo (un mes), pero aunque la germinación ocurre en todas las condiciones hay una diferencia cuantitativa en la respuesta a asociada con el medio, el tipo de carbohidrato y la concentración de este (Rubluo *et al.*, 1989).

Por lo tanto podemos ver que las concentraciones que se manejaron, no resultan ser tóxicas para las semillas de *Lactuca speciosa*, sin embargo para muchas otras especies estas concentraciones sí parecen serlo, ya que la acumulación de los productos tóxicos depende de la concentración del carbohidrato (Scott y Lyne, 1994).

La composición del medio también tiene una influencia marcada en el comportamiento de las semillas para que se inicie la germinación, Tremblay y Tremblay (1991) mencionan, que una concentración del 6% de sacarosa es óptima para el desarrollo de las semillas y que la sacarosa, glucosa y fructosa a diferentes concentraciones en los

diferentes tratamientos muestran patrones generales de respuesta para ambas especies (*Picea mariana* (Mill) y *Picea rubens* Sarg.), tal y como sucede en los resultados obtenidos en *Laelia speciosa* en éste trabajo al final de los 63 días de cultivo.

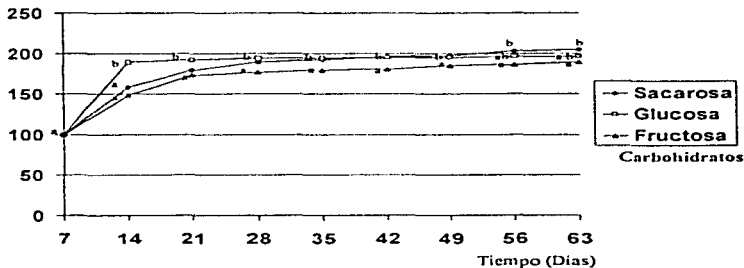
En el Índice de Desarrollo (I. de D.)

3) Influencia del tipo de carbohidrato sobre el índice de desarrollo

Los análisis de varianza realizados para cada tiempo de observación muestran que a los 7 días de iniciado el cultivo no hay diferencias significativas, todas las semillas se encontraban intactas, sin germinar (gráfica 4).

GRAFICA 4. INFLUENCIA DEL TIPO DE CARBOHIDRATO SOBRE EL INDICE DE DESARROLLO DE *Laelia speciosa*

Índice de desarrollo



No existen diferencias significativas en los valores marcados con la misma letra ($p < 0.05$)

A partir de los 14 y 21 días de cultivo la mayoría de las semillas están notablemente hinchadas, de color amarillo o verde (estadio II) en todos los tratamientos con los tres carbohidratos; los índices obtenidos en la sacarosa y fructosa son iguales estadísticamente y diferentes al de la glucosa, sin embargo en este carbohidrato se observa el mayor índice de desarrollo (189-192), en tanto que el menor se obtiene en la fructosa (148-173), por lo que

podemos observar que en glucosa las semillas están respondiendo más rápidamente al estímulo energético que les esta proporcionando éste carbohidrato y por consiguiente alcanzan más rápido el desarrollo, observándose más tempranamente semillas hinchadas, de color amarillo o verde (con o sin testa).

A los 28 y hasta los 49 días de cultivo los índices obtenidos en la sacarosa y la glucosa son estadísticamente iguales pero, a los 49 días en la sacarosa se obtiene el mayor I. de C. (196) y nuevamente en la fructosa se observa el menor (181). Por lo que se puede observar que en éste tiempo, en sacarosa las semillas se desarrollaron más rápidamente alcanzaron más rápido el estadio de semillas hinchadas, de color amarillo o verde; que en glucosa o fructosa.

A los 56 días y 63 días de cultivo el índice de desarrollo obtenido en glucosa es igual estadísticamente al de sacarosa y de fructosa, sin embargo estas son diferentes entre si, observándose el mayor índice en la sacarosa (203) (gráfica 4)

A menor tiempo la glucosa promueve más el índice de desarrollo y a mayor tiempo lo hace la sacarosa, y esto coincide con Whithner (1974) y Arditti (1992), sin embargo, los índices en la fructosa aunque sean significativamente menores a estos dos carbohidratos, no quiere decir que la fructosa no promueva el desarrollo del embrión durante la germinación, ya que probablemente los embriones requieren de mayor tiempo para que puedan metabolizar éste carbohidrato.

Aunque puede haber un tiempo en que tal vez el embrión pueda aprovechar y metabolizar las reservas de glucosa y fructosa y el índice de desarrollo en estos aumente, o pudiera ser que la fructosa se metaboliza en una tasa más lenta que la glucosa y la sacarosa durante el desarrollo del embrión en la germinación, tal vez si el desarrollo del embrión de la semilla durante la germinación se hubiera calculado en un tiempo mayor que 63 días, se hubieran observado índices mucho mayores que los obtenidos hasta estos 63 días en cultivo.

De lo anterior podemos ver que la probabilidad de que las semillas, al ser heterótrofas, se desarrollen y crezcan hasta plántulas sin carbohidratos es nula, ya que éstas son incapaces de sintetizar la sacarosa o algún otro carbohidrato, esto se ha observado en medios de cultivo que contienen tres carbohidratos (sacarosa, glucosa y fructosa), y se ha visto que al paso del tiempo éstas son hábiles para sintetizar estos carbohidratos y crecer

hasta plántulas completas y por lo tanto se vuelven autótrofas; ya que el papel principal de los carbohidratos es justamente que la plántula se desarrolle (Leroux *et al.*, 1995).

Se ha tomado como un indicio de esto, que si la sacarosa es un requerimiento para el crecimiento de las plántulas, esta puede ser sintetizada por las mismas a partir de la glucosa o la fructosa. Trabajos con otras especies de orquideas también han demostrado la facilidad que tienen las plántulas para sintetizar la sacarosa de otros carbohidratos (Smith, 1967)

Por lo tanto en éste trabajo se puede observar que la sacarosa, glucosa y fructosa son una fuente aceptable de energía para la germinación de la especie estudiada. Y que como lo mencionan Harrison y Arditti (1978) la sacarosa es necesaria por un periodo largo de tiempo (21-60 días) y no actúa solamente en un corto tiempo como estimulante.

En la sacarosa se han obtenido los mayores índices de desarrollo (420), en glucosa 400, y finalmente en fructosa, 250, después de los 60 días y hasta los 70 en este carbohidrato el índice de desarrollo se mantiene constante en tanto que en sacarosa y en glucosa aumenta (Harrison y Arditti, 1978)

4) Influencia de la concentración de los carbohidratos sobre el índice de desarrollo de *L. speciosa*

El análisis de varianza reveló que a los 7 días de cultivo no hubo diferencias significativas ($p \geq 0.05$) entre ninguna concentración, todas las semillas están en el primer estadio (semillas sin germinar) (gráfica 5)

A partir de los 14 días de cultivo el índice de desarrollo en la concentración al 1% es mayor (179) y diferente estadísticamente al obtenido en la concentración de 7% que es de (148)

A los 21 días de cultivo los índices en las concentraciones de 1, 3 y 5 % fueron de 181-194, resultaron iguales entre si y diferente al índice de desarrollo obtenido en la concentración de 10% (gráfica 5).

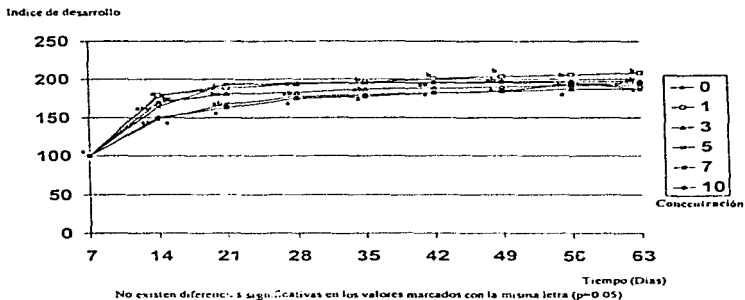
A los 28 y 35 días de cultivo, los índices obtenidos en las concentraciones de 1 y 5% resultaron iguales entre si pero diferentes a los observados en las concentraciones de 7 y 10% donde se obtiene el menor índice de desarrollo, entre 174 y 177 (gráfica 5).

A los 42 días de cultivo el índice de desarrollo en la concentración de 1% es mayor (200) y diferente a los obtenidos en las concentraciones de 7 y 10% (182) (gráfica 5).

A los 49 días de cultivo los índices obtenidos en las concentraciones de 1 y 5% son iguales entre sí, sin embargo el mayor índice (204) se observa en la concentración al 1%, el cual fue diferente estadísticamente a los obtenidos en las concentraciones de 3, 7 y 10% (gráfica 5).

A partir de los 56 y hasta los 63 días de cultivo los índices obtenidos en las concentraciones de 1, 3, 5 y 10% son iguales entre ellas, y en la concentración al 7% éste índice es diferente y menor (187) al obtenido en la concentración al 1% que fue de 206 a 207 para cada uno de los tiempos (gráfica 5).

GRAFICA 5. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE LOS CARBOHIDRATOS SOBRE EL INDICE DE DESARROLLO DE *Laelia speciosa*



Al principio puede observarse que a bajas concentraciones (1, 3 y 5%) hay mayor índice de desarrollo y que a altas concentraciones (7 y 10%) éste índice es menor. En general el índice de desarrollo refleja que la mayoría de las semillas están hinchadas, de color verde o amarillo (estadio II) y que sólo algunas cuantas alcanzaron los siguientes estadios (cuadro 4), esto se debe quizá a que las semillas necesitan de más tiempo para que se de más rápido este proceso de desarrollo del embrión y éste pueda iniciar más rápidamente la morfogénesis y se obtengan mayores índices.

Como se podrá constatar más adelante, realmente si es necesario mayor tiempo para que se disparen todos los procesos de desarrollo del embrión durante la germinación y así poder observar todos los estadios de éste. También podemos decir que realmente nuestros índices de desarrollo son bajos porque en estudios realizados se ha visto que a los 63 días, ya hay protocormos donde el índice de desarrollo es de 300, y que según Beyrle y Smith (1993a) reportan que en un medio suplementado con carbohidratos, a las 22 semanas se desarrollan protocormos con dos hojas pequeñas y una raíz, sin embargo este tiempo es diferente para cada especie; ya que nos reporta Smith (1967), que las semillas *Cattleya* en un medio de cultivo suplementado con sacarosa estaban totalmente hinchadas después de 12 días con un índice de desarrollo de 200 y aproximadamente a los 30 días estaban en la etapa de protocormo (con un índice de 300), en general no hubo presencia de hojas ni de raíces (Smith, 1967) pero esto depende de la especie que se este trabajando, las condiciones de cultivo, tipo y concentración del carbohidrato. En un medio suplementado con sacarosa al 2% las semillas de esta misma especie alcanzan la etapa de protocormo entre los 30-40 días.

Como podemos observar en los resultados de ésta investigación, nuevamente a bajas concentraciones (1, 3 y 5%) se promueve más el desarrollo de la semillas de *Laelia speciosa* durante la germinación y a altas concentraciones (7 y 10%) se observa menor promoción en este índice de desarrollo (gráfica 5), y esto coincide con los estudios realizados por Whitther (1974) y Arditti (1992), quienes mencionan que, a bajas concentraciones de carbohidratos se observa mayor promoción en la germinación de las orquídeas

En general, hasta los 63 días de cultivo, los I de D obtenidos reflejan que la mayoría de las semillas de *L. speciosa* empleadas en este estudio sólo llegaron al estadio de protocormo, con brote en la parte apical. Sin embargo, el resto pasaron a los siguientes estadios de desarrollo. Esto se puede observar en el cuadro 4. En éste tiempo, en la sacarosa únicamente el 1% del total de semillas, en el testigo (0%) llegaron al estadio de protocormo, con meristemo en la parte apical. Como podemos observar en el trabajo que realizaron St-Arnauld y colaboradores (1992) en un medio que contiene 2% de sacarosa las semillas de *Cattleya* alcanzan la etapa de protocormo sólo entre los 30-40 días.

En éste mismo carbohidrato en la concentración de 1% ya se puede observar claramente el efecto morfogénico de los carbohidratos, ya que hasta los 63 días cultivo se obtienen del 1 al 25% de semillas en estadio de protocormo, en la parte apical, pero a medida que la concentración de los carbohidratos aumenta, la proporción de semillas en éste estadio disminuye. Sin embargo, aunque esta proporción disminuye, se observa que a los 49 días en la concentración de 1% hay una inducción morfogénica del embrión alcanzándose el 1 al 6% de semillas en estadio de protocormo con primordio de hoja

Cuadro 4. Estadios de desarrollo III, IV y V, obtenidos durante la germinación de *L. speciosa* (H. B. K.) Schltr., con diferentes concentraciones y tipos de carbohidratos.

| Estado | Tiempo de cultivo(días) | Sacarosa | | | | Glucosa | | Fructosa | | | |
|------------|-------------------------|----------|----|----|----|---------|----|----------|----|----|----|
| | | n= 100 | | | | n= 100 | | n= 100 | | | |
| | | 0% | 1% | 3% | 7% | 10% | 1% | 10% | 0% | 1% | 3% |
| III | | | | | | | | | | | |
| | 14 | | | | | | | | | | 1 |
| | 21 | | 1 | | | | | | | | 1 |
| | 28 | | 9 | | | | | 1 | | | 2 |
| | 35 | | 13 | 2 | | | | 1 | | | 3 |
| | 42 | | 23 | 2 | | | 1 | 1 | | | 4 |
| | 49 | | 28 | 3 | 1 | | 1 | 1 | | | 5 |
| | 56 | | 25 | 5 | 1 | 16 | 2 | 1 | | 1 | 5 |
| | 63 | 1 | 25 | 6 | 3 | 16 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 |
| IV | | | | | | | | | | | |
| | 35 | | | | | | | | | | 1 |
| | 42 | | | | | | | | | | 1 |
| | 49 | | 1 | | | | | | | | 2 |
| | 56 | | 5 | | | | | | | | 2 |
| | 63 | | 6 | | | | | | | | 2 |
| V | | | | | | | | | | | |
| | 63 | | | | | | | | | | 1 |

III= Protocormo temprano (sin tallo), con meristemo en la parte apical

IV= Protocormo tardío con primordio de hoja

V= Plantulas con dos hojas distintas

A diferencia de la sacarosa y la fructosa, en la glucosa en la concentración de 1 y 10% únicamente se observa entre 1 y 3% de semillas en estadio de protocormo, con brote en la parte apical

En la fructosa aunque el efecto morfogénico de las semillas se observa tempranamente (14 días), en la concentración de 1%; sólo entre 1 y 3% de semillas totales se encuentran en el estadio antes mencionado, y éste porcentaje disminuye conforme la

concentración del carbohidrato aumenta. Sólo en fructosa en la concentración del 1%, observamos el estadio de plántulas con dos hojas distintas, aunque éste estadio se observa hasta los 63 días y sólo en el 1% de semillas totales.

Como podemos ver, en la fructosa se inicia más tempranamente (14 días) el metabolismo por éste carbohidrato y, que sólo en éste las semillas llegaron al estadio de plántulas con dos hojas distintas, comparado con glucosa y sacarosa, sin embargo en éste último hay mayor porcentaje (hasta 25%) de semillas en el estadio de protocormo, con brote en la parte apical. Por lo que podemos sugerir que en sacarosa se necesita de mayor tiempo para que se inicie la inducción morfogénica en el embrión, sin embargo, aunque en la fructosa se observan estadios posteriores, podemos concluir que en sacarosa se observa mayor I. de D (gráficas 4 y 5)

Aunque no obtenemos estadios más allá de protocormo discoide, con primordio de hoja, al menos hasta los 63 días de concluidas las observaciones, los embriones conservaron siempre su vigor y no como ocurre en otras investigaciones en las cuales se obtiene un alto porcentaje de germinación (33.8%) en el medio MS y el desarrollo de protocormos es satisfactorio (Orkoc y Dalci, 1993), sin embargo las semillas de algunas especies requieren de tres meses para germinar (presencia de protocormos) y más de seis meses para el desarrollo de plántulas otras, seis meses para germinar pero en todos los casos llegan o no a la etapa de protocormo pero finalmente mueren (Hoshi *et al.*, 1994) también mencionan que la presencia de carbohidratos y otros nutrientes no afecta la formación de protocormos (Kerbaui, 1991) Sin embargo, Mezzetti y colaboradores (1991) realizaron un balance de estos tres carbohidratos (sacarosa, glucosa y fructosa) en el sistema medio-explante y llegaron a la conclusión de que la utilización de éstos continua en todo el periodo de cultivo.

No obstante en los resultados de algunas investigaciones (Conner *et al.*, 1993) la glucosa y la sacarosa a altas concentraciones de 1, 3 y 5% son superiores a la fructosa, adicionando sacarosa y glucosa en el medio incrementa la proliferación de protocormos y el índice de desarrollo.

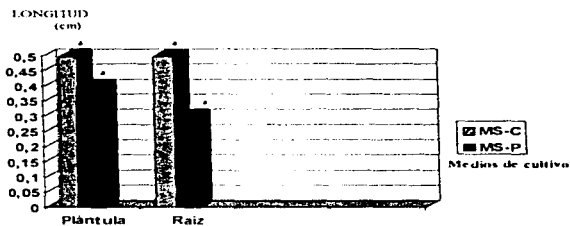
DESARROLLO Y CRECIMIENTO

Influencia del Tipo de Medio de Cultivo sobre:

1) La Longitud de Plántulas y Raíces de *L. speciosa*.

Los análisis de varianza muestran que después de tres meses en cultivo las plántulas tienen una longitud de 0.4 cm en el medio preparado y de 0.5 cm en el medio comercial y que no hay diferencias significativas estadísticamente ($p \geq 0.05$) para la longitud de la plántula en ningún tipo de medio, sin embargo, las plántulas alcanzan una longitud mayor en el medio MS-Comercial, lo mismo sucede en la longitud de la raíz más larga ya que en el medio preparado alcanza una longitud de 0.3 cm mientras que en el medio comercial llegan hasta 0.5 cm, sin embargo, estadísticamente no hay diferencias significativas para estos dos parámetros (gráfica 6).

GRAFICA 6. INFLUENCIA DEL TIPO DE MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA LONGITUD PLANTULAS Y RAICES DE *Laetia speciosa*



No existen diferencias significativas en los valores marcados con la misma letra ($p < 0.05$)

MS-C= Medio Murashige Sigma Comercial
MS-P= Medio Murashige Sigma Preparado

Como podemos observar en los resultados, se obtienen tamaños mayores en cuanto a longitud de plántulas y raíces en el medio MS-Comercial marca Sigma que en el medio MS-Preparado, aunque los dos medios tienen los mismos componentes, podemos sugerir que lo que influye para observar éstas diferencias en las longitudes es sin duda el modo de elaboración de cada uno; ya que el medio preparado, como se indica se prepara en el laboratorio y al pesar las cantidades tanto de micro y macronutrientes, así como medir las

cantidades de agua para disolver éstas hay menor exactitud y, en el medio comercial éstas medidas sean más exactas.

Los macro y los microelementos juegan un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo de las plántulas de orquideas. Sin embargo, en condiciones naturales se observa que las orquideas tienen también un crecimiento pero, éste está restringido por la disponibilidad de los nutrientes, aún así los mecanismos morfológicos, fisiológicos y/o ecológicos deben estar presentes para posibilitar el crecimiento en esas condiciones nutricionales (Stancato y Faria, 1996).

Un medio de cultivo adecuado debe estar constituido por macro y micronutrientes, además de contener vitaminas, hormonas, carbohidratos, entre otros, para el desarrollo y crecimiento vigoroso de las plantas (Manzanares, 1987)

Los resultados de éste trabajo pueden estar relacionados con las diferentes respuestas que tienen las plántulas de orquideas en diferentes medios de cultivo, ya que un medio puede promover más el enraizamiento y otro no lo hace. Algunos autores como Stancato y Faria (1996) han encontrado que las plántulas de *Laelia cunabarina* en el medio con pocos nutrientes y azúcares resultan frágiles con hojas pequeñas y cloróticas, y que cuando se omiten los micronutrientes ocurre una reducción significativa en el crecimiento de las plántulas.

Zettler y colaboradores (1995) reportan que en plántulas de *Spiranthes odorata* en un medio asimbiótico, la diferenciación de raíces ocurre después de 2½ meses y también durante este tiempo aparece el primordio de hoja. Aunque el desarrollo de protocormos a plántulas es variable no todas las semillas germinadas llegaron a la etapa de plántula. Algunas plántulas se tornan negras y no tienen progreso. Sin embargo, en otros casos todos los protocormos cultivados se desarrollan hasta plántula, esto es debido quizá al tipo de medio o las condiciones de cultivo (Rubluo *et al.*, 1989). Lo cual pudo estar afectando en cultivo de *Laelia speciosa*.

Los resultados demuestran que el medio MS comercial marca sigma suplementado con carbohidratos es una excelente fuente de energía y que promueve tanto la longitud de la plántula así como de las raíces, y estos concuerdan con los reportados por Gaya y Suner (1995) para *Bletilla striata* en donde en el medio MS más del 95% de las plántulas *B. striata*

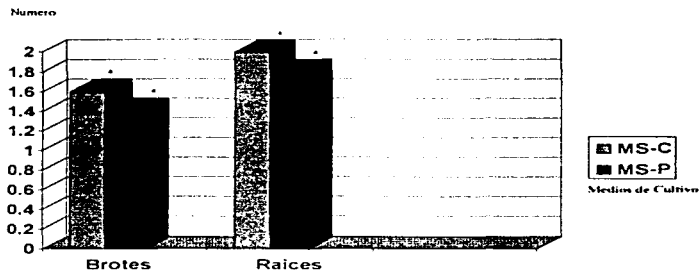
enraizaron y alcanzaron una longitud de 3 cm; al igual que Rublwo y colaboradores (1989) encontraron que después de 90 días en cultivo en el medio MS y Knudson C las plántulas de *Bletia urbana* en general alcanzan la etapa adulta (plántulas con hojas de al menos 3 cm de largo, pseudobulbos y raíces).

Los dos medios de cultivo promueven la proliferación de las estructuras y esto concuerda con un estudio que realizaron Harrison y Arditti (1978), donde observaron que las plántulas de *Cattleya aurantiaca* el medio Knudson C enraizaron a los 28 días de cultivo, sin embargo, no desarrollaron hojas y en el medio Knudson-Sacarosa las plántulas continuaron su desarrollo.

11) El Número de Brotes y Raíces de *L. speciosa*.

El análisis de varianza muestra que no existen diferencias significativas ($p \geq 0.05$) en cuanto al número de brotes en los dos medios, aunque en el medio comercial la proliferación de brotes es mayor (1.6) comparado con el medio MS-Preparado (1.4) (gráfica 7).

GRÁFICA 7. INFLUENCIA DEL TIPO DE MEDIO DE CULTIVO SOBRE EL NÚMERO DE BROTES Y RAÍCES DE *Laelia speciosa*



No existen diferencias significativas en los valores marcados con la misma letra ($p < 0.05$).

MS-C = Medio Murashige Skoog Comercial

MS-P = Medio Murashige Skoog Preparado

Como podemos observar realmente la cantidad de brotes obtenidos a los 3 meses es alta si se compara con los obtenidos en otros trabajos (Dalton y Thomas, 1992), sin

embargo, estos autores coinciden con nosotros al decir que en el medio MS suplementado con carbohidratos ocurre un incremento prematuro de formación de brotes y también ocasiona que haya menos potencial osmótico, lo cual ocasiona que los brotes adquieran una tonalidad verdosa en *Lolium temulentum* (Dalton y Thomas, 1992).

En cuanto al número de raíces tampoco existen diferencias significativas estadísticamente ($p \geq 0.05$), sin embargo hay más proliferación de raíces en el medio comercial (2.0) que en el medio preparado (1.8) (gráfica 7)

Estos resultados sugieren que el medio de cultivo MS-Comercial marca Sigma y el Preparado utilizados están favoreciendo el crecimiento y desarrollo de las raíces en *Laelia speciosa* y que el tiempo en el cual ocurren estos eventos es significativamente corto (tres meses), comparado con el de otros trabajos en los que las plántulas requieren de un tiempo mayor para tener raíces, tal como reportan St-Arnauld (1989) y colaboradores que las plántulas de *Cypripedium acaule* cultivadas en el medio MS, a los 6 meses generalmente comprenden de las siguientes estructuras un protocormo, 1 ó 2 raíces del protocormo, 2 ó 4 brotes con 1 ó 4 raíces adventicias, también podemos observar que las semillas de *Cattleya massiaco* germinan y se diferencian en el medio Pfeffer, que contiene 1% de sacarosa, en la ausencia de esta carbohidrato los embriones no presentaron desarrollo después de la etapa de esférula.

El medio MS-Comercial marca Sigma es el mejor para la diferenciación de raíces, brotes y desarrollo de hojas en *Laelia speciosa* lo cual concuerda con Nagashima (1993) quién nos menciona que el medio MS es más eficiente para el desarrollo y crecimiento de plántulas

Nuestros resultados coinciden con varios autores (Dalton y Thomas, 1992 y Nagashima, 1993) aunque con otros no y esto se debe quizá a que no se está trabajando con la misma especie y por lo tanto cada especie tiene un patrón de comportamiento distinto en cada medio nutritivo.

Influencia del Tipo de Carbohidrato Sobre:

III) La Longitud de Plántulas y Raíces de *L. speciosa*

El análisis de varianza muestra que para la altura de las plántulas la glucosa es igual estadísticamente a la fructosa y sacarosa, mientras que entre estas dos si hay diferencias significativas.

Sin embargo, en la sacarosa se observa que las plántulas alcanzan la mayor longitud (0.6 cm) y en la fructosa la menor longitud (0.2 cm) (gráfica 8) Como podemos ver nuevamente la sacarosa es la promueve más la longitud de la plántula sin embargo esto no quiere decir que los otros dos carbohidratos no lo hagan, tal vez estos necesitan un poco más de tiempo para que puedan alcanzar los niveles de sacarosa, y esto concuerda con lo reportado por Beyrle y Smith (1993b), quienes han observado que una fuente externa de carbohidratos a diferentes tiempos aumenta la longitud, número y el crecimiento de raíces y aumenta el porcentaje de plantas fotosintéticas de *Orchismorio*

GRAFICA 8. INFLUENCIA DE LOS CARBOHIDRATOS SOBRE LA LONGITUD DE PLANTULAS Y RAICES DE *Tachia speciosa*



No existen diferencias significativas en los valores marcados con la misma letra (p < 0.05)

En esta investigación, fue evidente que los carbohidratos son necesarios tanto para la proliferación de plántulas como de raíces. Harrison y Arditti (1978) han estudiado la relación que tiene el tipo de carbohidrato en el desarrollo y crecimiento de las plántulas de orquídeas, encontrando que las semillas de *Cattleya* crecen y se desarrollan hasta la etapa de primera

hoja en el medio que contiene sacarosa y que las plántulas enraizaron a los 28 días, sin embargo, ninguno de los protocormos transferidos a carbohidrato alcanzaron la etapa de primera hoja. Ellos llegaron a la conclusión de que la presencia de hojas y de raíces puede ocurrir durante los primeros 28 días de subcultivo. Aunque estudios posteriores demostraron que en efecto la sacarosa se requiere por un periodo largo de tiempo (21-60 días) y no actúa en un corto tiempo solamente como estimulante.

Los resultados para la longitud de la raíz muestran que la glucosa es igual estadísticamente a la fructosa y sacarosa, sin embargo estas dos son diferentes entre sí estadísticamente.

Nuevamente en la sacarosa se vuelve a observar una longitud mayor para la raíz más larga (0.6 cm) y la menor en la fructosa (0.2 cm) (gráfica 8), aunque algunos autores Withner (1974) mencionan que la glucosa que es un azúcar simple que se introduce en el tejido de las orquídeas y es el que más se ha utilizado para la diferenciación y crecimiento así como fuente de energía para las orquídeas por ser el mejor estimulante de la proliferación tanto de hojas como de raíces.

Se puede observar que la glucosa esta promoviendo esta proliferación pero lo hace en menor grado que la sacarosa, por lo tanto cambios en la composición de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) en el medio promueven la proliferación *in vitro* de raíces, y longitud de las plántulas, tal y como reportan Mezzetti y colaboradores (1991) en *Actinidia delictosa*, estos carbohidratos promueven la proliferación de callos, estambres y hojas. Sin embargo muchos otros autores Levi y Sink (1992) mencionan, que el tipo de carbohidrato afecta la tasa crecimiento y desarrollo y, por lo tanto, la fructosa en el medio de cultivo aumenta la formación de brotes, mientras que la glucosa los suprime, pero aumenta la proliferación de plántulas con brotes y raíces.

En *Potato tuber* la sacarosa promueve solamente la formación de raíces (Levi y Sink, 1992), esto sugiere que la fuente de carbohidratos puede influenciar el tipo de órgano diferenciado, pero nosotros realmente estamos viendo que en *Laelia speciosa* todos los carbohidratos están promoviendo tanto la longitud de plántulas como la longitud de raíces, aunque la sacarosa es la fuente de energía que promueve más la proliferación de estos.

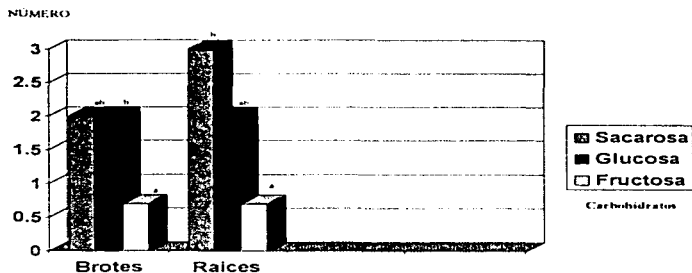
IV) El Número de Brotes y Raíces de *L. speciosa*

Podemos observar que estadísticamente la sacarosa es igual a la glucosa y fructosa, pero éstos dos son diferentes entre sí. Sin embargo, el carbohidrato que promueve más la proliferación de brotes es la glucosa (2.0) seguido de la sacarosa (1.8) y finalmente la fructosa (0.7) (gráfica 9)

Nuestros resultados concuerdan con Bach y Pawlowska (1993) los cuales observaron que la sacarosa y glucosa son superiores a la fructosa en la inducción de brotes de *Hyacinthus orientalis* L.

Sin embargo, Taeb y Alderson (1990), observaron que el número de brotes está influenciado significativamente por la interacción de los niveles de sacarosa y el tiempo de incubación, al 3% de Sacarosa disminuye el número de brotes, en sus reportes manifiestan que la sacarosa estimula el mayor porcentaje de brotes (18.3%) y en la glucosa a esta concentración se reduce el porcentaje de brotes (7.1%)

GRÁFICA 9. INFLUENCIA DE CARBOHIDRATOS SOBRE EL NÚMERO DE BROTES Y RAICES DE *Laelia speciosa*



No existen diferencias significativas en los valores marcados con la misma letra (p < 0.05)

Esto hace suponer que el medio que contiene sacarosa (agente osmótico) induce más intensamente la producción de brotes, esto sugiere que está estimula y sincroniza la morfogénesis a través de condiciones osmóticas en los subcultivos (Leva y Muleo, 1993).

En el número de raíces observamos que la glucosa es igual estadísticamente a la sacarosa y fructosa, pero estos dos últimos son diferentes entre sí. La sacarosa es el carbohidrato que promueve más y mejor la proliferación en el número de raíces (2.8) seguido de la glucosa (2.2) y finalmente la fructosa (0.7) (gráfica 9). Estos resultados sugieren que incrementando los niveles de sacarosa en el medio aumenta el desarrollo de brotes, tal y como lo mencionan Yves y colaboradores (1987), que en este carbohidrato a altas concentraciones hay un incremento significativo en la proliferación de raíces después de 9 meses del trasplante original, más raíces 95% se forman a una concentración óptima de sacarosa 7%.

Sin embargo otros autores sugieren que para la propagación *in vitro* de Oca (*Oxalis tuberosa*), en un medio que contiene 30 y 60g/l de sacarosa no afecta la tasa de multiplicación de raíces. La única diferencia que se observa es que a altos niveles de sacarosa promueve entrenudos más cortos y se promueven mayor cantidad de raíces (Conner *et al.*, 1993).

Podemos observar que tanto en la glucosa como en la sacarosa el número de brotes y raíces es alto y por lo tanto estos azúcares promueven la proliferación de los mismos, lo cual concuerda con Karhu y Ulvinen (1995), quienes reportan que el número de raíces y el subsecuente crecimiento de brotes es alto en el medio suplementado con sacarosa; en el medio que contiene carbohidratos el porcentaje de brotes y raíces es alto (Beyrle y Smith, 1993a).

Podemos sugerir que en realidad los tres carbohidratos utilizados están promoviendo los brotes y raíces, aunque la fructosa siempre lo hace en menor grado. Pero algunos autores están de acuerdo en que la sacarosa y la glucosa realmente inducen la proliferación de estos, pero que la fructosa no lo hace, ello nos hace sugerir que los requerimientos de los carbohidratos dependen de la fase de cultivo, todo lo antes mencionado concuerda con Romano y colaboradores (1995), los cuales encontraron un alto número de raíces en el medio que contiene glucosa, y que el número de raíces adventicias se incrementa con la concentración de glucosa y fructosa.

Estos resultados muestran que los requerimientos de los carbohidratos durante la micropropagación dependen de la fase de cultivo. La sacarosa al 3% y la glucosa al 4% son

la mejor fuente de carbón durante la fase de proliferación de raíces. Se producen brotes y raíces en fructosa. Solamente hay producción de raíces en glucosa y sacarosa (Okezie *et al.*, 1991).

Sin embargo, nuestros resultados muestran que la sacarosa fue la fuente de carbón preferente e induce una tasa alta de proliferación de raíces, pero también favorece la elongación de brotes, la fructosa si estimula la proliferación de brotes, y de raíces; pero lo hace en menor grado, y en esta investigación la sacarosa fue la mejor fuente de carbón para la promoción de raíces seguido de la glucosa y finalmente la fructosa.

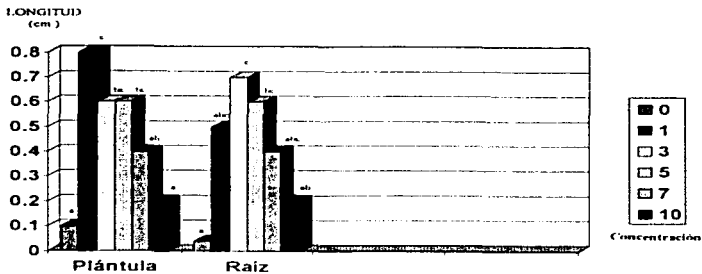
Efecto de la Concentración del Carbohidrato Sobre:

V) La Longitud de Plántulas y Raíces de *L. speciosa*

El análisis de varianza para la altura de las plántulas muestra que en la concentración de 1% es mayor (0.8 cm) y significativamente diferente a las concentraciones de 0, 10 y 7%.

En los resultados podemos observar que a bajas concentraciones (1, 3 y 5%) se promueve mayor longitud de las plántulas y que en realidad las plántulas si necesitan de azúcares para continuar su crecimiento hasta la etapa adulta, puesto que a la concentración de 0% se obtiene una menor altura (0.3 cm) (gráfica 10).

GRÁFICA 10. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS CARBOHIDRATOS SOBRE LA LONGITUD DE PLANTULAS Y RAÍCES DE *Leuca speciosa*



No existen diferencias significativas en los valores marcados con la misma letra ($p < 0.05$)

Esto resultados concuerdan con Levi y Sink (1992), quienes en su estudio comentan que las concentraciones de sacarosa, glucosa y fructosa tienen un efecto marcado en la formación de callos, esto nos dice que para el éxito en la formación y maduración de embriones requiere cantidades altas de carbohidratos (4-10%) y para la germinación y crecimiento niveles bajos. Sin embargo los resultados obtenidos muestran que la inducción y maduración de etapas puede tener diferentes requerimientos para cada tipo y concentración de carbohidrato.

El análisis de varianza para la longitud de la raíz más larga muestran que la concentración de 7% es significativamente igual a las demás concentraciones, mientras que en la concentración de 3% es mayor (0.7 cm) y significativamente diferente en las concentraciones de 0 y 10% (0.7 cm). Por lo tanto a bajas concentraciones (1, 3 y 5%) se obtienen raíces más largas (gráfica 10)

Esto concuerda con el estudio que realizaron Beyrle y Smith, (1993a), con plántulas de *Orchis morio*, ellos observaron que con la adición de sacarosa al 1% las plántulas presentan mayor altura y desarrollan raíces grandes. Mientras Taeb y Alderson (1990) encontraron que las plántulas de orquídeas alcanzan alto número de raíces en el medio que contiene glucosa (1-6%)

Al parecer la fructosa se metaboliza en una tasa más lenta que la glucosa y la sacarosa durante la formación de brotes, y de otras estructuras. Nuestras observaciones muestran que la inducción y maduración en diferentes etapas puede tener diferentes requerimientos para cada tipo y concentración de carbohidrato.

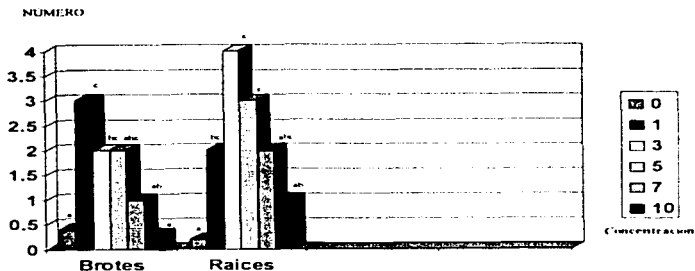
VI) El Número de Brotes y Raíces de *Laelia speciosa*.

Los resultados muestran que en el análisis de varianza para el número de brotes la concentración de 5% es significativamente igual a todas las demás concentraciones, mientras que la concentración de 1% es mayor (3.0) y significativamente diferente a las concentraciones de 0, 7 y 10%. Por lo tanto a bajas concentraciones (1, 3 y 5%) se obtiene mayor número de brotes y a altas concentraciones (7 y 10%) el menor (gráfica 11)

Estos resultados concuerdan con Rice (1984), quien reporta que para el tulipán, en un medio suplementado de 3 a 6% de sacarosa aumenta el número de brotes, mientras que concentraciones muy altas (7 y 10%) inhiben la proliferación de brotes al igual que Taeb y

Alderson (1990) mencionan que incrementando los niveles de sacarosa en el medio (3 a 6%) aumenta progresivamente el desarrollo de brotes mientras que Balaizi y Boxus (1995) observaron un alto número de brotes en *Quercus suber* con glucosa, sacarosa y fructosa a 1.5 y 3%. En glucosa al 3% hay un elevado número de brotes, pero sin embargo en la sacarosa este número de brotes es mayor que en la glucosa y sacarosa. Aunque la glucosa al 3% fue la mejor fuente de carbohidrato que promovió no solamente la tasa de propagación sino también la calidad de brotes, esto apoya la hipótesis de que un alto contenido de sacarosa *in vitro* es importante para el desarrollo de brotes.

GRÁFICA 11. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS CARBOHIDRATOS SOBRE EL NÚMERO DE BROTES Y RAÍCES DE *Larix speciosa*



No existen diferencias significativas en los valores marcados con la misma letra (p < 0.05)

En general a todas las concentraciones se observó la proliferación de brotes, sin embargo a bajas concentraciones (1, 3 y 5%) esta proliferación fue más acentuada (gráfica 11), algunos autores sugieren que incrementando la concentración de azúcar en el medio aumenta el desarrollo de brotes; y que el desarrollo de brotes depende del tipo de carbohidrato. Altos niveles de glucosa y sacarosa están asociados con un alto número (4.5) y un alto porcentaje (20.7%) en la proliferación de brotes (Taeb y Alderson, 1990). En los brotes cultivados *in vitro* de *Rosa multiflora* a concentraciones de 0, 1, 3 y 5% la talla de los

estos se incrementa con los niveles de sacarosa en el cultivo. El número de brotes en sacarosa al 5% fue muy alto (por arriba del 1.3%) en tanto que al 3% (por arriba del 0.45%) y al 1% (cerca del 0.27%) (Capellades, 1991).

El análisis de varianza para el número de raíces de *Laelia speciosa* muestra que las concentraciones de 7 y 1% son significativamente iguales a las concentraciones restantes, y que la concentración de 3% es mayor (4) y significativamente diferente a las concentraciones de 0 y 10%. Podemos observar que a bajas concentraciones (1, 3 y 5%) hay mayor proliferación de raíces y que a altas concentraciones (7 y 10%) esta proliferación disminuye (gráfica 11).

Estos resultados concuerdan con varios autores que nos mencionan que con la adición de sacarosa al 1% las plántulas de *Orchis morio* desarrollan raíces grandes (Beyile y Smith, 1993a), mientras que Taeb y Alderson (1990), nos mencionan ocurre un alto número de raíces en el medio que contiene glucosa (1-6%) y que la sacarosa al 3% y la glucosa al 4% son la mejor fuente de carbón durante la fase de proliferación de raíces.

Sin embargo, todo ello nos hace sugerir que en nuestros resultados las diferentes concentraciones utilizadas están promoviendo la proliferación tanto de brotes como de raíces, siendo más efectivas a bajas concentraciones (1, 3 y 5%) esta proliferación sea más acentuada.

CONCLUSIONES

Las semillas con mayores dimensiones (0.57 mm de largo y 0.18 mm de ancho) y el embrión (0.34 mm de largo y 0.13 mm de ancho), tuvieron mayor porcentaje de viabilidad (76%).

El hipoclorito al 6.0% y el tiempo de exposición a éste no parecen ser tóxicos para las semillas de *Laelia speciosa*, este agente desinfectante es efectivo para las semillas de dicha especie.

La germinación de las semillas de *Laelia speciosa* se ve incrementada por el efecto de la exposición al desinfectante, observándose una germinación por arriba del 80% en todos los tiempos de exposición.

La sacarosa es el mejor carbohidrato promotor de la germinación de semillas, seguido de glucosa y finalmente sacarosa.

A concentraciones de (1, 3 y 5%) de carbohidratos hay mayor estímulo para la germinación de las semillas de *Laelia speciosa*.

La sacarosa, es el mejor carbohidrato promotor del desarrollo de las semillas, seguido de la glucosa y finalmente la fructosa.

A concentraciones de (1, 3 y 5%) de carbohidratos se observa un mayor desarrollo en las semillas de *Laelia speciosa*.

El medio MS-Comercial marca Sigma a comparación del preparado, promueve mayor longitud área y longitud de la raíz, así como también es el mejor para la promoción de brotes y de raíces

La sacarosa es el mejor carbohidrato para promover la longitud tanto de los vástagos así como de las raíces, seguido de glucosa y finalmente fructosa.

La glucosa es el mejor carbohidrato que promueve la proliferación de brotes y raíces, seguido de la sacarosa y finalmente la fructosa.

A concentraciones de (1, 3 y 5%) de carbohidratos se promueve mayor longitud de los vástagos y raíces, mayor número de brotes y raíces.

En el medio MS-Comercial las plántulas obtenidas presentaron mayor vigor en la germinación, crecimiento y desarrollo; así como apariencia que, las del medio MS-Preparado.

ANEXO

Cuadro 1. Componentes del medio de cultivo MS, Preparado y Comercial.

| SALES INORGÁNICAS MS - PREPARADO | | SALES INORGÁNICAS MS-SIGMA COMERCIAL* (Mezcla de Sales Básicas) | |
|---|-------------|--|-------------|
| MACRONUTRIENTES | mg/l | MACRONUTRIENTES | |
| MgSO ₄ 7 H ₂ O | 370.0 | MgSO ₄ 7 H ₂ O | |
| NH ₄ NO ₃ | 1650.0 | NH ₄ NO ₃ | |
| KH ₂ PO ₄ | 170.0 | KH ₂ PO ₄ | |
| KNO ₃ | 1900.0 | KNO ₃ | |
| CaCl ₂ | 440.0 | CaCl ₂ | |
| MICRONUTRIENTES | mg/l | MICRONUTRIENTES | |
| ZnSO ₄ 7 H ₂ O | 8.6 | ZnSO ₄ 7 H ₂ O | |
| CoCl ₂ 6H ₂ O | 0.025 | CoCl ₂ 6H ₂ O | |
| H ₃ BO ₃ | 6.2 | H ₃ BO ₃ | |
| MnSO ₄ H ₂ O | 22.3 | MnSO ₄ H ₂ O | |
| CuSO ₄ 5 H ₂ O | 0.025 | CuSO ₄ 5 H ₂ O | |
| NaMoO ₄ 2 H ₂ O | 0.25 | NaMoO ₄ 2 H ₂ O | |
| KI | 0.83 | KI | |
| Na ₂ EDTA | 37.3 | Na ₂ EDTA | |
| FeSO ₄ 7 H ₂ O | 27.8 | FeSO ₄ 7 H ₂ O | |
| CONSTITUYENTES ORGÁNICOS | mg/l | CONSTITUYENTES ORGÁNICOS | |
| Myo - Inositol | 100.0 | Myo - Inositol | |
| Tiamina HCl (B ₁) | 0.4 | Tiamina HCl (B ₁) | |
| Niacina o Ac. Nicotínico | 0.5 | Niacina o Ac. Nicotínico | |
| Pridoxina (B ₆) | 0.1 | Pridoxina (B ₆) | |
| CARBOHIDRATOS* | | CARBOHIDRATOS** | |
| Glucosa | | Glucosa | |
| Fructosa | | Fructosa | |
| Sacarosa | | Sacarosa | |
| AGENTE GELIFICANTE | mg/l | AGENTE GELIFICANTE | mg/l |
| Agar Bioxón | 10000.0 | Agar Bioxón | 4000.0 |

*Se requieren 4.3 g de éste para preparar 1 litro de medio

**Se supl. empujaron diferentes concentraciones

Cuadro 2. Tratamientos para germinación y desarrollo de semillas de *L. speciosa*.

| Carbohidratos / Concentración (%) | 0 | 1 | 3 | 5 | 7 | 10 |
|-----------------------------------|---|---|---|---|---|----|
| Sacarosa | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6* |
| Glucosa | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Fructosa | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |

*Tratamiento

Cuadro 3. Valores correspondientes a los Estadios de Desarrollo durante la Germinación de Semillas de Orquídeas.

| Valor | Estadio |
|-------|---|
| I | Semillas sin germinar |
| II | Semillas hinchadas y de color amarillo o verde (con o sin testa) |
| III | Protocormo temprano (sin testa), con meristemo en la parte apical |
| IV | Protocormo discoide con primordio de hoja |
| V | Plántulas con dos hojas distintas |
| VI | Plántulas con dos hojas y al menos una raíz verdadera |

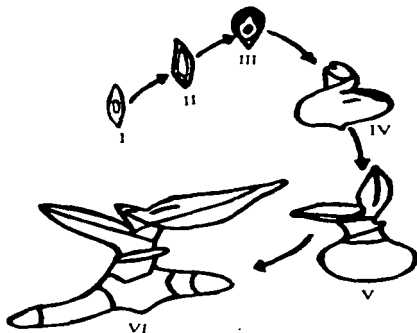


Figura 2. Estadios de desarrollo durante la germinación del género *Laelia* sp. (Tomado de Arditti, J., 1967; Luna S. y A. Barba, 1994).

BIBLIOGRAFIA

- Abraham, A and P.Vatsala. 1981. *Introduction to Orchids with Illustrations of 159 South Indian Orchids*. Tropical Botanic Garden and Research Institute, India. 533 pp.
- Anderson, B. A. 1991. Symbiotic and Asymbiotic Germination and Growth of *Spiranthes magnicamporum* (Orchidaceae) *Lindleyana* 6(4) 183-186.
- Arditti, J. 1967 (a). Factors affecting the germination of Orchid seeds *Botanical Review*. 33: 1-97.
- Arditti, J., J. D. Michaud, and A. P. Oliva. 1981. Seed Germination of North American Orchids I Native California and Related Species of *Calypso*, *Epipactis*, *Goodyera*, *Pineria*, and *Platanthera* *Botanical Gazette*. 142(4). 442-453.
- Arditti, J. 1982. *Orchid Biology: Reviews and Perspectives II*. Cornell University Press. E. U. A. 390 pp
- Arditti, J and R. Ernst. 1984. *Physiology of Germination Orchid Seeds* Arditti, J. (Eds), *Orchid Biology: Reviews and Perspectives, II*. Cornell University Press, Ithaca, N. Y. 177-222 p.
- Arditti, J. 1990. *Orchid Biology: Reviews and Perspectives V* Timber Press Portland, Oregon U S A. 451 pp
- Arditti, J. 1992. *Fundamentals of Orchid Biology* John Wiley and Sons, Inc. U S A
- Arditti, J and R. Ernst. 1993. *Micropropagation of Orchids*. Department of Developmental and Cell. John Wiley and Sons, Inc. U S A. 650 pp
- Association of Official Seed Certifying Agencies*. 1971. *Certification Handbook* Publication 23
- Bach, A. and B. Pawlowska. 1993. Effect of Type of Carbohydrate in Regeneration of *Lilacanthus orientalis* L. in Long-Term Cultures *Folia Horticulturae* 5(2) 3-11
- Baker, M. K., M. C. Mathes and B. J. Wallace. 1987. Germination of *Phontieva* and *Cattleya* Seeds and Development of *Phalaenopsis* Protocorms *Lindleyana* 2(2).77-83.
- Belaizi, M and P. Boxus. 1995. *In vitro* Shoot Multiplication of Cork Oak (*Quercus suber* L.) Influence of Different Carbohydrates *Bouletim des Recherches Agronomiques de Gembloux* 30(1, 2) 39-46
- Beyrle, H. F. and S. E. Smith. 1993a. The Effect of Carbohydrate on the Development of a *Cattleya* Hybrid Association with its Mycorrhizal Fungus *Lindleyana* 3(2) 57-62
- Beyrle, H. F. and S. E. Smith. 1993b. Excessive Carbon Prevents Greening of Leaves in Mycorrhizal Seedling of the Terrestrial Orchid *Orchismorio*. *Lindleyana* 8(2) 97-99.
- Bonner, J. 1969. *Principios de Fisiologia Vegetal* 5ta ed. Aguilar, S. A. España. 485 pp
- Caneva, S. 1978. *Orquideas: Principales Géneros y Especies, su Cultivo*. Albatros Buenos Aires, Argentina. 230 pp.
- Capellades, L., R. Lemeur, R. and P. Debergh. 1991. Effects of Sucrose on Starch Accumulation and Rate of Photosynthesis in Rose Cultured *in vitro* *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 25(1). 21-26
- Clemens, M. A. 1988. Orchid Mycorrhizal Associations *Lindleyana* 3(2). 73-86.
- Conner, A. J., A. J. Zhang and A. R. Wooding. 1993. Micropropagation of Oca on a High Sucrose Medium Promotes Starch Accumulation and Plant Establishment in Soil. New Zealand. *Journal of Crop and Horticultural Science*. 21(1).91-93.

- Chase, M. W. And J. S. Pippen. 1990. Seed Morphology and Phylogeny in Subtribe Catasetinae (Orchidaceae). *Lindleyana*. 5(2): 126-133.
- Chu C. C. and K. W. Mudge. 1994. Effects of Prechilling and Liquid Suspension Culture on Seed Germination of the Yellow Lady's Slipper Orchid (*Cypripedium calceolus* var. *pubescens*) *Lindleyana* 9(3): 153-159.
- Cronquist, A. 1981. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press. New York. 1262 pp.
- Dalton, S. J. and I. D. Thomas. 1991. A Statistical Comparison of Various Factors on Embryogenic Proliferation, Morphogenesis and Regeneration in *Lolium tremulentum* Cell Suspension Colonies. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 30(15): 15-29.
- Dijk, E. 1989. *Effects of Mycorrhizal Fungi on in vitro Nitrogen Response of Juvenile Orchids*. Elsevier Science Publisher, B. V., Amsterdam. 91-97 p
- Dressler, L. R. 1981. *The Orchid Natural History and Classification*. Harvard University Press. Cambridge Massachusetts and London England. 332 pp
- Dressler, L. R. 1993. *Phylogeny and Classification of the Orchid Family*. Dioscorides Press. Portland Oregon 314 pp
- Duffus, C. 1985. *Las Semillas y sus Usos*. AGT Editor, S. A. México 148 pp.
- Ernst, R. 1967. Effect of Carbohydrate Selection on the Growth Rate of Freshly Germinated *Phalaenopsis* and *Dendrobium* seed. *Bull. Amer. Orchid Soc.* 36: 1068-1073.
- Ernst, R., J. Arditti and L. P. Healey. 1971. Carbohydrate Physiology of Orchid Seedlings. II. Hydrolysis and Effects of Oligosaccharides. *Amer. J. Bot.* 58: 827-835.
- Ernst, R. and E. Rodriguez. 1984. Carbohydrates of the Orchidaceae. Arditti, J. (Eds). *Orchid Biology: Reviews and Perspectives III*. Cornell, University Press U. S. A. 225-259 pp
- Gaya and T. Suner. 1995. *In vitro* Cultivation of Orchids. *Horticultura, Revista de Horticultura, Flores y Plantas Ornamentales*. 108: 99-100
- Goh, C. J. And J. Arditti. 1985. Orchidaceae. In *CRC Handbook of Flowering*. Ed. A. H. Havelly. Boca Raton. CRC Press Inc.
- Halbinger, F. 1993. *Laetas de México*. Asociación Mexicana de Orquideología, A. C. México. 71 pp
- Han, K. and L. C. Stephens. 1992. Carbohydrate and Nitrogen Affect Respectively *in vitro* Germination of Immature Ovules and Early Seedling Growth of *Impatiens platypetala* Lindl. *Plant Cell and Organ Culture*. 31: 211-214
- Handley, G. and Pegg. 1989. *Fungus-Plant Relationships in Orchid Mycorrhizal Systems*. Cambridge University, Grain Britain. 57-72 pp
- Harrison, C. R., J. and Arditti. 1978. Physiological Changes During the Germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). *Botanical Gazette*. 39: 180-189.
- Hernández, A. M. 1992. *Dinámica Poblaciones de Laelia speciosa* (H. B. K.) Schltr. Lic. en Biología. 138 pp. Facultad de Ciencias. UNAM. 138 pp.
- Hew, S. C. & Yong H. W. 1994. Growth and Photosynthesis of *Oncidium 'Goldiana'*. *Botanical Gazette*. 69(5): 809-819.
- Hoshi, Y., K. Kondo, K. and S. Hamatani. 1994. *in vitro* Seed Germination of Four Asiatic Taxa of *Cypripedium montanum*. *Lindleyana*. 9(2):93-97.

- Ichihashi, S. 1979. Studies on the Media for Orchid Seed Germination. IV. Influence of the Characteristics of Some Culture Media on the Growth of Orchid Seedlings. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 48(3): 345-352
- I. U. C. N. (INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE) 1985. *Rare and Threatened Plant List*. Threatened Plant Comitee Botanic Garden Conservation, Coordinating Body, Kew, England
- Kerbaux, G. B. 1991. In vitro Conversion of *Cattleya* Root Tip Cells in Protocorm-Like Bodies. *Journal of Plant Physiology*. 138(2): 248-251
- Karhu, S. T. and S. K. Ulvinen 1995. The Effect of Different Carbohydrates on the Rooting of Micropropagated Apple Shoots and their Adaptation After Transplantation. *Bulletin des Recherches Agronomiques de Gembloux* 30(1, 2). 87-101
- Koleff, O. P. 1988. Propagación *in vitro* de Variedades Selectas de Frambuesa y Zarzamora (*Rubus* sp) Tesis Profesional. ENEP-ZARAGOZA México 160 pp
- Larson, L. A. 1988. *Introducción a la Floricultura*. AGT Editor Chapingo Texcoco, México 359 pp
- Lee, J. K., K. Y. Peek; H. S. Lee and S. H. Sin 1982. Studies on the Non-Symbiotic Germination of *Laelia briggeri* Seeds. I. Morphological Characters of Germinating Seeds, and Effects of p11, Sucrose and Growth Regulators on Seed Germination. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science* 23 (2) 163-171
- Leifert, C., S. Pryce, P. J. Lumsden and Waites, W. M. 1992. Effect of Medium Acidity on Growth and Rooting of Different Plant Species Growing *in vitro*. *Plant Cell and Organ Culture*. 30. 171-179
- Leroux, G., D. Barabé et J. Vietch 1995. Morphogenèse Comparée de Protocormes du *Cypripedium acaule* (Orchidaceae) Cultivés *in vitro* Avec ou Sans Sucre. *Can. J. Bot* 73: 1391-1409
- Leva, A. and R. Muleo 1993. Effects of "Media Osmotic Agents" on the Growth and Morphogenesis of *Actinidia deliciosa* cv. "Hayward" Callus *in vitro*. *Cellular and Developmental Biology Plant* 29(2): 59-64
- Levi, A. and K. Sink. 1992. *Asparagus* somatic embryos Production in Suspension Culture and Conversion to Plantlets on Solidified Medium as Influenced by Carbohydrate Regime. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 31(2) 115-122
- Lin, Y. K., C. C. Chen, F. T. Yeh, N. Y. Chiu and H. S. Tsay 1994. Tissue Culture of *Hellelilla formosana* I. The Influence of Seed Maturity and Pretreatment on Seed Germination and Seedling Development. *Journal of Agricultural Research of China*. 43(1): 40-50
- Luna, R. B. y I. Cosmes 1989. Estudios del Desarrollo Ontogénico del Embrión de la orquídea *Laelia speciosa* Durante su Germinación *in vitro*. *Memorias del III Congreso Nacional de Biotecnología y Biongeniería*. Monterrey, N. L.
- Manzanares, M. 1987. Medio de Cultivo. Hurtado, M. (Eds). *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Trillas México 67-85 pp.
- Marden, C. 1990. *Orchids for the Home and Green House*. Brooklyn Botanic Garden, N. Y. 88 pp
- Martínez, P. A. 1981. Propagación Masiva *in vitro* y Recuperación de Poblaciones de Orquídeas en Peligro de Extinción. Tesis de Maestría, UNAM. México.

- Mezzetti, B., L. S. Conte and P. Rosati 1991. *Actinidia deliciosa* in vitro II. Growth and Exogenous Carbohydrates Utilization by Explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 26(3): 153-160.
- Millán, S. and D. Davidson. 1992. The use flax (*Linum usitatissimum*) as a Model System for Studies on Organogenesis in vitro: the Effect of Different Carbohydrates. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 28: 163-166.
- Moreno, E. M. 1984. *Análisis Físico y Biológico de Semillas Agrícolas*. UNAM. México. 383 pp.
- Muir, H. J. 1987. Symbiotic Micropropagation of *Orchis laxiflora*. *The Orchid Review*. 95. 27-29.
- Nagashima, T. 1993. Studies on the Relationship Between Embryogenesis and Germination in Orchidaceae. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 62(3): 581-594
- Okezie, C. E. A., S. N. C. Okonkwo and F. I. O. Nwoke. 1991. Carbon Source Requirement for the Culture of White yam (*Dioscorea rotundata*) embryos in vitro. *Acta Horticulturae* 380 329-334
- Oliva, A. P. and J. Arditti. 1984. Seed Germination of Noth American Orchids II Native California and Related Species of *Aplectrum*, *Cypripedium*, and *Spiranthes*. *Botanical Gazette*. 145(4):495-501
- Orquideas 1980. Museo Nacional de Costa Rica Depto De Historia Natural 1-40 pp
- Osborne, D. J. 1980. Nucleic Acids and seed germination. Khan A. A (Ed) *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*. Biomedical Press Netherlands 447 pp
- Ozkoc, J. And M. Dalci. (a) 1993. Germination of the Seeds of *Serapias vomeracea* (Burm. fil) Briq Subs *Laxiflora* (Soo) Golz et Reinhard (Orchidaceae) Through Asymbiotic Culture Techniques. *Doga Tiyk Biyoloji Dergisi*. 17(1). 5-11
- Ozkoc, J. And M. Dalci. (b) 1993. The Effect of Some Fungi Upon Germination and Development of *Orchis laxiflora* Lam (Orchidaceae) Seeds of Two Different Media. *Doga Tiyk Biyoloji Dergisi*. 17(1) 23-28
- Penningsfeld, F. 1985. Soilless Propagation and Cultivation of Orchids Possibilities, Advantages and Disadvantages. *Soilless Culture*. 1(1) 55-66
- Pritchard, H. 1989. *Modern Methods in Orchid Conservation: The Role of Physiology, Ecology and Management*. Cambridge University Press. U S A. 173 pp
- Rao, A. N. 1977. Tissue Culture in the Orchid Industry. In *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Cultures*. (Eds) J. Reinert et Y. P. S. Bajaj. Springer, Berlin 47-69 p
- Raven, P. H. 1976. Ethics and Attitudes in Conservation of Threatened Plants, NATO Conference Series, 1. *Ecology*. 1 155-180. Plenum Press, New York.
- Rice, R. D. 1984. Shoot and Bulb Development on Tulip Floral Stem Tissue in vitro. Tesis, Nottingham University, UK.
- Romano, A., C. Noronha and M. A. Martins-Luciao 1995. Role of Carbohydrates in Micropropagation of *Cork oak*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 40(2): 159-167.

- Rubluo, A., V. Chávez and A. Martínez. 1989 *In vitro* Seed Germination and Re-introduction of *Bletia urbana* (Orchidaceae) in its Natural Habitat. *Limleyana*. 4(2):68-73
- Scagel, R. F., R. J. Bandoni, J. R. Maze, G. E. Rouse, W. B. Schofield y J. R. Stein 1987 *El Reino Vegetal*. Omega, S. A., Barcelona 778 pp.
- Scott, P. and R. Lyne. 1994. Initiation of Embryogenesis from Cultured Barley Microspores. A Further Investigation into the Toxic Effects of Sucrosa and Glucose. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1 (37) 61-65.
- Seaton, P. T. and N. S. J. Hailes. 1989. Effect of Temperature and Moisture Content on the Viability of *Cattleya aurantiaca*. Seed Pritchard H. W. (Ed) *Modern Methods in Orchid Conservation: The Role Physiology, Ecology and Management*. Cambridge University Press U. S. A. 17-29 pp.
- Shoushtari, B. D., R. Heydari, G. L. Johnson and J. Arditti 1994. Germination and Viability Staining of Orchid Seeds Following Prolonged Storage. *Limleyana* 9(2): 77-84
- Shushan, S. 1959. Developmental Anatomy of an Orchid, *Cattleya x Trimos*. Withner, L. C. (Ed). *The Orchids*. Ronal Press Co. New York. 45-72 pp.
- Smith, S. E. 1967. Carbohydrate Translocation in Orchid Mycorrhizas. *New Phytol* 66: 371-378.
- St-Arnaud, M., D. Lauzer and D. Barabé 1992. *In vitro* Germination and Early Growth of Seedlings of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). *Limleyana* 7(1) 22-27.
- Stacanto, G. C. and R. T. Faria 1996. *In vitro* Growth and Mineral Nutrition of the Lithophytic Orchid *Laelia cinnabanna* Batem. (Orchidaceae) I. Effects of Macro and Microelements. *Limleyana* 11(1) 41-43.
- Strasburger, E., F. Noll, H. Schenck, y A. F. W. Schimper 1988. *Tratado de Botánica* 32a edic. Barcelona, España. 1098 pp.
- Taeb, A. G. and P. G. Alderson 1990. Effect of Low Temperature and Sucrose on Bulb Development and on the Carbohydrate Status of Bulbing Shoots of Tulip *in vitro*. *Journal of Horticultural Science* 65(2) 193-197.
- Tremblay, L. and F. M. Tremblay 1991. Carbohydrate Requirements for the Development of Black Spruce (*Picea mariana* (Mill.) B. S. P.) and Red Spruce (*P. rubens* Sarg.) Somatic Embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 27(1):95-103.
- Tsutsui, K. And M. Tomita 1990. Suitability of several Carbohydrates as the Carbon Sources for Symbiotic Seedling Growth of Two orchid Species. *Limleyana* 5(2): 134-139.
- Tyson, N. R. 1990. *Home Orchid Growing* 4ta ed. Prentice Hall Press New -York. 376 pp.
- Valencia, J. 1992. Efecto de la Sacarosa en el Desarrollo y Crecimiento de *Laelia speciosa in vitro*. Tesis Profesional. UNAM FES-ZARAGOZA. México 188 pp.
- Waes V. J. M. and Debergh 1986. Adaptation of the Tetrazolium method for testing the seed viability, and scanning electron microscopy study of some Western European Orchid. *Physiology Plant* 66: 435-442.
- Weberling, F. 1987. *Botánica Sistemática*. Omega Barcelona, España. 154-156 pp.
- Weier, E. T., C. R. Stocking y M. G. Barbour. *Botánica* 5ta. Ed. Limusa, México. 741 pp.
- Withner, L. C. 1959. *The Orchids A Scientific Survey*. Robert E. Krieger. Publishing Company. Malabar, Florida. U. S. A. 648 pp.

- Withner L. C. 1974. Developments in Orchid Physiology. In *The Orchids Scientific Studies*. (Ed). Withner, Wiley, New York. 129-168 pp
- Yanagawa, T., M. Nagai, T. Ogino and R. Maeguchi. 1995. Application of Desinfectants to Orchid Seeds, Plantlets and Media as a Means to Prevent *in vitro* Contamination. *Lindleyana*. 10(1): 33-36
- Yves, D., H. Tiessen and P. M. Harney. 1987. The Effect of Sucrose and Ancymidol on the *in vitro* Rooting of Nodal Sections of *Asparagus*. *HortScience*. 22(1): 131-137.
- Zettler, W. L. and T. M. McInnis, Jr. 1992. Propagation of *Platanthera integrilabia* (Correll) Luer., an Endangered Terrestrial Orchid, Through Symbiotic Seed germination. *Lindleyana* 7(3): 154-161
- Zettler, W. L. and T. M. McInnis, Jr. 1993. Symbiotic Seed Germination and Developmental of *Spiranthes cernua* and *Goodyera pubescens* (Orchidaceae: Spiranthoideae). *Lindleyana*. 8(3): 155-162.
- Zettler, W. L., F. V. Barrington and T. M. McInnis, Jr. 1995. Developmental Morphology of *Spiranthes odorata* Seedlings in Symbiotic Culture. *Lindleyana*. 10(3): 211-216.