

30
2^{es.}



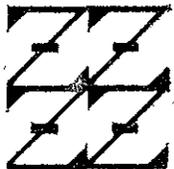
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

“EFECTO DEL ESTIMULO POR FRUCTOSA Y
GLUCOSA AL INICIO DE LA GERMINACION DE
SEMILLAS DE *Laelia speciosa* (H.B.K.) SCHLTR”.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A N :
MARIA DEL CARMEN NEYRA MARTINEZ
HORTENSIA ROSAS ACEVEDO

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



LO HUMANO ES
DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTOR: M. EN C. BARBARA SUSANA LUNA ROSALES

MEXICO, D. F.

265297

1998.

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

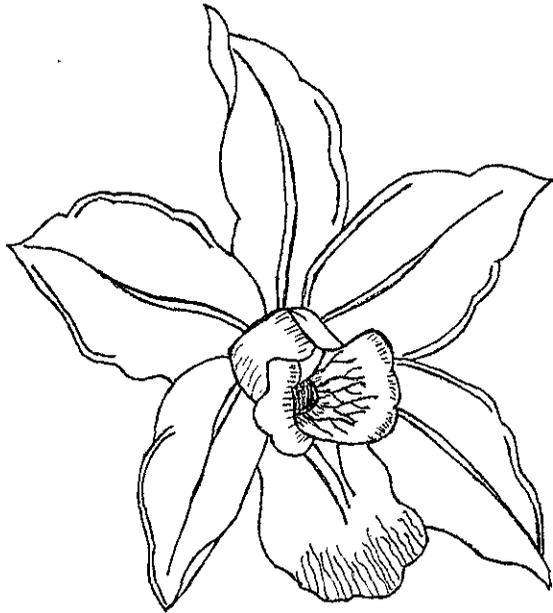
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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.

El presente trabajo de tesis se realizó en la Unidad de Investigación en Biología Vegetal de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza". Bajo la dirección de la M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales como parte del proyecto: " Estudio del desarrollo morfogénico y estructural del embrión de *Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr. durante su germinación asimbiótica".

Apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) con la clave: DGAPA/PAPIIT IN206895.



Un agradecimiento muy especial a la M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales por su confianza, paciencia, pero sobre todo por su valioso apoyo sin el cual no hubiera sido posible la realización de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

Un reconocimiento especial al M. en C. Armando Cervantes por su apoyo en el análisis estadístico.

Al M. en C. Amadeo Barba Alvarez por su apoyo técnico y por sus acertados comentarios para el mejoramiento de esta tesis.

A los miembros del jurado:

Biol. Balbina Vazquez Benitez
M. en C. Ma. Socorro Orozco Almanza
Biol. Carlos Castillejos Cruz

Por sus comentarios y correcciones que ayudaron a mejorar esta tesis.

DEDICATORIAS

A mis padres

Teresa y Domingo en agradecimiento a todo su amor, comprensión y apoyo que me han dado.

A mis hermanos

Martha y Juan que llenan mi vida de momentos felices.

A Marco

Por todo su cariño, comprensión y sus innumerables muestras de apoyo.

A Claudia

Por la dicha de haberla conocido.

A mis amigos y compañeros de laboratorio

Hortensia, Bety, Susana, Xóchitl, Raúl, Juan, Verónica, Jorge y Jaqueline por todo su apoyo.

C A R M E N

DEDICATORIAS

A mis padres

Juan y Concepción con cariño y respeto por ser siempre ese rayo de sol que ilumina mis días

A mis hermanas

Adriana, Emma, Laura, Cecilia, Mirna y especialmente a Mónica por todo su cariño, su apoyo y por estar siempre ahí cuando las necesito.

A mis hermanos

Juan, Alberto, German, Claudio, Ricardo y Luis por su cariño, su apoyo y por todos los buenos momentos que hemos vivido juntos.

A mis sobrinos

Victor, Raquel, Imelda y Rebeca por sus risas y alegría que lo llenan todo.

A mis amigos

Carmen, Susy, Bety, Xóchitl, Raúl, Miguel, Wendy y Juan Francisco por que me han dado su amistad y muchos momentos de alegría.

HORTENSIA

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	
Generalidades de orquídeas	5
Características generales de las semillas de orquídea	6
Germinación de las semillas de orquídea	7
Asociación micorrízica de las semillas de orquídea	8
Germinación asimbiótica de las semillas de orquídea	8
Efecto de fructosa y glucosa en la germinación de semillas de orquídeas	9
Requerimientos temporales de los carbohidratos al inicio de la Germinación	10
Efecto de carbohidratos sobre la respuesta morfogénica durante el proceso de germinación de <i>Laelia</i>	11
Características generales de <i>Laelia speciosa</i>	11
OBJETIVOS	15
HIPÓTESIS	15
METODOLOGÍA	
Material biológico	16
Prueba de viabilidad	16
Germinación <i>in vitro</i>	16
Desinfestación y siembra	17
Incubación	17
Efecto del estímulo de fructosa y glucosa al inicio de la germinación	18
Porcentaje de germinación	18
Índice de desarrollo	19
Diseño estadístico	19
RESULTADO Y DISCUSIÓN	
Viabilidad	20
Porcentaje de germinación	21
Índice de desarrollo	25
Tiempo mínimo requerido para inducir la respuesta morfogénica en embriones de <i>Laelia speciosa</i>	32
Plántulas con al menos una raíz verdadera (estadio 6)	33
CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFÍA	36
ANEXO	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estadios de desarrollo durante la germinación de orquídeas	7
Tabla 2. Composición del medio de cultivo Murashige-Skoog	41
Tabla 3. Diseño experimental para <i>Laelia speciosa</i>	18
Tabla 4. Viabilidad de semillas de <i>Laelia speciosa</i>	20
Tabla 5. Probabilidad de obtener un valor $F >$ al observado en la germinación de <i>Laelia speciosa</i> , con relación a los factores: tipo de carbohidrato, tipo de esterilización y tiempo de exposición	42
Tabla 6. Probabilidad de obtener un valor $F >$ al observado en el desarrollo de <i>Laelia speciosa</i> , con relación a los factores: tipo de carbohidrato, tipo de esterilización y tiempo de exposición	43

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Efecto del estímulo limitado por fructosa y glucosa en la germinación de <i>Laelia speciosa</i> a los 7 días de cultivo	22
Gráfica 2. Efecto del estímulo limitado por fructosa y glucosa en la germinación de <i>Laelia speciosa</i> a los 21 días de cultivo	23
Gráfica 3. Efecto del estímulo limitado por fructosa y glucosa en la germinación de <i>Laelia speciosa</i> a los 98 días de cultivo	23
Gráfica 4. Efecto del estímulo limitado por fructosa y glucosa en el desarrollo de <i>Laelia speciosa</i> a los 21 días de cultivo	25
Gráfica 5. Efecto del estímulo limitado por fructosa y glucosa en el desarrollo de <i>Laelia speciosa</i> a los 42 días de cultivo	26
Gráfica 6. Efecto del estímulo limitado por fructosa y glucosa en el desarrollo de <i>Laelia speciosa</i> a los 56 días de cultivo	27
Gráfica 7. Efecto del estímulo limitado por fructosa y glucosa en el desarrollo de <i>Laelia speciosa</i> a los 98 días de cultivo	28
Gráfica 8. Efecto del estímulo por fructosa y glucosa en el desarrollo durante 21 días de exposición	29
Gráfica 9. Efecto del estímulo por fructosa y glucosa en el desarrollo durante 30 días de exposición	29
Gráfico 10. Efecto del estímulo por fructosa y glucosa en el desarrollo durante 45 días de exposición	30

Gráfica 11. Efecto del estímulo por fructosa y glucosa en el desarrollo durante 38 días de exposición	30
Gráfica 12. Efecto del estímulo por fructosa y glucosa en el desarrollo durante 52 días de exposición	31
Gráfica 13. Efecto del estímulo por fructosa y glucosa en el desarrollo durante 60 días de exposición	31
Gráfica 14. Efecto del estímulo por fructosa y glucosa en el desarrollo durante 98 días de exposición	32
Gráfica 15. Porcentaje de protocormos que formaron plántulas en función de los tiempos de exposición a los carbohidratos	33
Gráfica 16. Plántulas con al menos una raíz verdadera (estadio seis) obtenidas al final del cultivo	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Planta de <i>Laelia speciosa</i> (tomado de Halbinger, 1993)	14
---	----

ABREVIATURAS

TTC	Tetrazolio
MS	Murashige-Skoog
<i>UV</i>	Ultravioleta
I.D	Índice de desarrollo
FA	Fructosa esterilizada por autoclave
FF	Fructosa esterilizada por filtración
GA	Glucosa esterilizada por autoclave
GF	Glucosa esterilizada por filtración

RESUMEN

Se colectaron frutos de *Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr en la localidad de Coenembo, Michoacán, se determinó la viabilidad de las semillas de los frutos empleando el método del tetrazolio; y se utilizó el fruto que presentó el mayor porcentaje de semillas viables (88%). Estas semillas se cultivaron *in vitro* sobre un medio Murshige-Skoog, que contenía como fuente de carbohidrato fructosa y glucosa; ambos carbohidratos se esterilizaron mediante dos métodos: autoclave y filtración. Las semillas se mantuvieron bajo el estímulo limitado de estos carbohidratos durante diferentes tiempos (7, 15, 21, 30, 38, 45, 52, 60 y el testigo de 98 días), para determinar el efecto sobre la respuesta morfogénica del embrión, así como para establecer el tiempo mínimo requerido de las semillas sobre estos carbohidratos para inducir su respuesta morfogénica.

Los máximos porcentajes de germinación que se obtuvieron tanto en fructosa como en glucosa esterilizadas por ambos métodos se encontraron en el rango de 94% y 100%. La glucosa esterilizada por ambos métodos indujo una respuesta morfogénica en los embriones; en tanto que la fructosa induce dicha respuesta sólo cuando se esteriliza por filtración. El índice de desarrollo que se alcanzó al final del cultivo fue de 400 (estadio de plántula con una hoja) en ambos carbohidratos, excepto sobre fructosa esterilizada por autoclave. El tiempo mínimo requerido del estímulo por glucosa esterilizada por ambos métodos y fructosa esterilizada por filtración para inducir una respuesta morfogénica en los embriones de *Laelia speciosa* fue de 38 días; dicha respuesta se inició a partir de los 42 días de iniciada la siembra. Al término del cultivo, el máximo porcentaje de plántulas en estadio 6 (con al menos una raíz verdadera) se obtuvo en los testigos de fructosa esterilizada por filtración (29%) y en glucosa esterilizada por autoclave y filtración los cuales fueron de 23% y 21% respectivamente

INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae, está considerada como una de las familias más numerosas representada por 35000 especies, incluidas en 900 géneros (Dressler, 1981; Arditti, 1992). En la República Mexicana se conocen alrededor de 1000 especies de orquídeas, de las cuales el 35% son endémicas (Soto, 1988). Se considera a varias especies de esta familia como taxa vulnerables desde el punto de vista de la UICN, básicamente, por su valor hortícola, comercial y por la destrucción de sus hábitats con mayor diversidad y endemismos (Soto & Hagsater, 1990).

Los frutos o cápsulas de orquídeas generalmente pueden contener entre 500 mil hasta cuatro millones de semillas, las cuales son desnudas y miden usualmente menos de un milímetro de largo, su embrión está rodeado por una testa trasparente, se encuentra relativamente indiferenciado cuando maduro, no presenta cotiledón o endospermo; sus pocas reservas energéticas, están almacenadas en el propio embrión, presentes como pequeños gránulos de almidón y gotas de lípidos (Harrison 1977; Harrison & Arditti, 1978; Ernst & Rodríguez, 1984; Peterson & Currah, 1990; Arditti, 1992). Al respecto Harrison (1977), Peterson y Currah (1990), comentan que estas reservas sólo pueden ser utilizadas para iniciar su germinación y no son suficientes para continuar su desarrollo.

A diferencia de la mayoría de las angiospermas, las semillas de orquídea deberán llegar a un sustrato con condiciones óptimas de humedad, acidez, luz, además de establecer una relación simbiótica con un hongo micorrízico específico que le proporcionará los carbohidratos y otros metabolitos necesarios para su germinación (Rao, 1977; De Lapiner, 1973; Del Castillo & Ackerman, 1992). Por otro lado, en condiciones asimbióticas la asociación micorrízica no es esencial para la germinación y el desarrollo de las semillas de orquídeas, ya que se puede lograr con un aporte adecuado de azúcares simples solubles (St-Arnaud *et al.*, 1992), y así pasar del estadio de protocormo (estadio considerado intermedio entre el embrión y plántula), al estadio de plántula (Richardson *et al.*, 1992).

Arditti y Ernst (1984), citan que el procedimiento de cultivo asimbiótico fue propuesto por L. Knudson, en 1922, quien demostró que algunas semillas de orquídeas pueden germinar asimbióticamente en un medio adecuado. A partir de este descubrimiento muchos investigadores usando el medio basal de Knudson se han dedicado a estudiar el papel de los carbohidratos en la germinación de semillas de orquídeas epífitas y tropicales. De esta manera, se han identificado carbohidratos capaces o incapaces de promover la germinación, ya que las orquídeas varían dentro de especies y géneros de la misma familia en sus requerimientos de distintos tipos de azúcares para este proceso; sin embargo, en

algunos casos los problemas fisiológicos son más complejos que si una fuente de carbono es apropiada o no. La lista de los azúcares capaces de disparar la germinación no es nueva, y las semillas de orquídeas no son la excepción a la regla, de que los organismos superiores generalmente usan azúcares- D.

Los carbohidratos además de ser una fuente de carbono y energía para el embrión son el estímulo disparador para su desarrollo morfogénico durante la germinación (Luna & Barba, 1993). Es importante señalar que en general se habla de carbohidratos genéricamente sin señalar la importancia del tipo, los requerimientos temporales de los mismos (Arditti & Ernst, 1984), y la concentración de estos disponible en el medio. Estos factores pueden afectar el crecimiento heterotrófico de los cultivos, debido a que el azúcar es la única fuente de carbón y energía para el crecimiento (Kubota & Toyoki, 1991).

Los carbohidratos pueden ser empleados esterilizados por filtración, utilizando membranas a baja presión, y en autoclave (Arditti & Ernst, 1984; Juárez, 1994). La esterilización en autoclave del medio de cultivo hidroliza la sacarosa y posiblemente otros azúcares y actualmente no está claro como las semillas de orquídeas utilizan o les afectan los oligosacáridos una vez que estos son esterilizados (Ernst *et al.*, 1971).

Por otro lado, ya que existen proteínas, vitaminas, aminoácidos, extractos vegetales, hormonas; así como algunos azúcares que son termolábiles y pueden descomponerse durante la esterilización en autoclave, las soluciones que los contienen, pueden ser esterilizadas mediante el paso de éstas a través de filtros de esterilización muy finos que no permiten el paso de partículas más grandes de 0.45μ (Abraham & Vatsala, 1981).

Es importante señalar que muchas de las especies de orquídeas mexicanas, debido a lo atractivo de sus flores han estado sujetas a colectas exhaustivas y la alteración de sus ecosistemas ha contribuido a la erosión genética y a la disminución de las poblaciones silvestres, esto ha ocasionado que un gran número de ellas estén amenazadas de extinción (Currah *et al.*, 1990; Martínez, 1991; Hoshi *et al.*, 1994).

Laelia speciosa es una de las orquídeas mexicanas más vistosas y más ampliamente colectada. Esta especie epífita conocida con el nombre "Flor de Mayo" es endémica del Altiplano Central de México, y presenta flores muy bellas de gran tamaño. Este atractivo la convierte en una de las especies más sobrecolectadas debido a la gran demanda que hay de ellas. Por otra parte, es apreciada por presentar una floración temprana y por ser resistente a la sequía. Esta serie de consideraciones y la disminución de sus poblaciones naturales la han colocado dentro de la categoría de "vulnerable". En esta categoría de acuerdo con la UICN se incluye los taxa que presenta poblaciones en decremento (Soto & Hagsater, 1990).

Algunas instituciones como la Asociación Mexicana de Orquideología (AMO), se han preocupado por la conservación de las especies de orquídeas mexicanas, por lo cual han emprendido distintos proyectos tendientes hacia su preservación. Además, la continúa pérdida de los bosques tropicales y los problemas inherentes con la conservación *ex situ* de especies amenazadas, hace imperativo desarrollar métodos eficaces para la preservación de especies tropicales (Thornhill & Koopowitz, 1992). Uno de los métodos es germinar las semillas *in vitro* en favor de mantener la variabilidad genética (Zettler *et al.*, 1995) y más tarde reintroducirlas a su medio natural (Hernández, 1992).

Para esta especie se cuenta ya con algunos estudios sobre la biología de su germinación (Luna & Barba, 1993; Velázquez, 1997), y algunos estudios preliminares sobre los requerimientos temporales de carbohidrato al inicio de su germinación (Buentello *et al.*, 1997; Neyra *et al.*, 1997).

En esta investigación se estudiaron los efectos de la exposición limitada con fructosa y glucosa al inicio de la germinación de semillas de *Laelia speciosa* en un medio aséptico, así como también el efecto del método de esterilización de los carbohidratos sobre la germinación y desarrollo de las semillas.

ANTECEDENTES

GENERALIDADES DE ORQUÍDEAS

Los atributos estéticos de la mayoría de las orquídeas, expresados en flores de caprichosas formas, vistosos colores, y atractivos aromas, son responsables de la estima que se les tiene como flores de ornato. Sus expresiones biológicas son extremadamente interesantes; sus mecanismos de polinización, en donde el lenguaje de atracción hacia abejas, mariposas y colibríes es sorprendente; sus asociaciones simbióticas con hongos, indispensables en muchos casos para sobrevivir durante las etapas críticas de la germinación; sus características cosmopolitas por ser habitantes de ríos, pantanos, selvas, bosques y desiertos; sus características de colonizadoras secundarias, como por ejemplo de reciente actividad volcánica, o bien de cortezas arbóreas de muy diversos tipos y colores; son sólo algunas de sus muchas peculiaridades (Peña & Peña, 1981).

Las orquídeas se distinguen de las demás plantas principalmente por sus flores, sus raíces, su sistema vegetativo, sus semillas y por presentar una amplia variedad de formas y tamaños.

Las flores por diferentes que parezcan siempre presentan la misma estructura, poseen un cáliz formado por tres sépalos verdes o de color, corola constituido por tres pétalos alternados con los sépalos. El pétalo dorsal con frecuencia está sumamente modificado, tanto en color como en forma, generalmente es más grande y llamativo y tiene la finalidad de atraer o guiar a los insectos polinizadores, este pétalo se conoce también como labio o labelo y le da a la flor una simetría bilateral lo que se conoce como zigomorfismo.

Internas a los sépalos y pétalos se encuentran las partes fértiles que constituyen un aspecto único en esta familia. En el centro de la flor se encuentra la columna, la cual es la fusión de los órganos reproductores femeninos y masculinos.

En la mayoría de las orquídeas el número de las anteras está reducido de tres a uno (que es el número usual en las monocotiledóneas). La antera, usualmente se encuentra en el ápice de la columna, justo encima o debajo del estigma. A diferencia de prácticamente todas las otras plantas floríferas, el polen está agregado en unas masas llamadas polinios, estos pueden ser granulares, duros, suaves y cerosos. Los polinios con sus estructuras asociadas constituyen los polinarios.

Otra estructura importante es el rostelo que sirve como un dique para evitar la autopolinización. El viscidio sirve para adherir el polinario al cuerpo del polinizador. En algunas orquídeas, unas caudículas relativamente débiles y elásticas, adhieren los polinos al viscidio, mientras que en otras especies los adhieren al estípite.

El órgano final de la columna es el ovario que es ínfero, esto es, se inicia dónde los sépalos y pétalos se unen en la base de la flor, y produce numerosos óvulos diminutos. Después de la fertilización, el ovario se convierte en el fruto, que será una cápsula, o una baya, cuando se trate de las vainillas (*Vanilla sp.*). Los óvulos fecundados se convierten en diminutas semillas, semejantes a polvo, compuestas solamente por el embrión que está envuelto por una cubierta fina y transparente, conocida como testa. En algunas orquídeas el fruto puede contener millares y en muchos casos hasta millones de semillas (Del Castillo & Ackerman, 1992; Mittelstaedt, 1993).

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS SEMILLAS DE ORQUÍDEAS

Las orquídeas constituyen un caso único en la naturaleza, ya que tras millones de años de evolución, lograron abandonar el suelo del bosque y desarrollaron una nueva clase de semilla tan diminuta y liviana que flotara en el aire. Lo cual las provee de un medio eficiente de dispersión para así caer en árboles lejanos perpetuando la especie (Mittelstaedt, 1993; Hollingsworth & Dickson, 1997).

Las semillas son extremadamente pequeñas, miden entre 0.08-0.75 mm de ancho por 0.3-5 mm de longitud y pesan entre 1.5- 14 μg (Arditti, 1992).

Presentan un pequeño embrión (constituido por 4 ó 5 tipos de células), suspensor, epidermis, cortex y meristemo; que se encuentra suspendido dentro de un retículo o testa transparente constituida por una sola capa de células (Clements, 1988; Smreciu & Currah, 1989; Peterson & Currah, 1990; Arditti, 1992; Del Castillo & Ackerman, 1992).

Los embriones de orquídeas son pequeños cuerpos elipsoidales (Nishimura, 1981) y pueden medir entre 30-100 μm de ancho por 150-300 μm de largo y ocupan sólo una proporción muy pequeña del espacio interno de la semilla. Como resultado, éstas podrían consistir de 70 a 95% de aire (Arditti, 1992) lo cual le da gran flotabilidad por largos períodos de tiempo y la capacidad de dispersarse a grandes distancias tanto en el aire como en el agua (Abraham & Vatsala 1981; Arditti, 1992).

El embrión se encuentra relativamente indiferenciado cuando madura, sin cotiledón ni endospermo; contiene una cantidad limitada de reservas (Harrison & Arditti, 1978; Ernst & Rodríguez, 1984; Arditti, 1992; Harrison 1977; Peterson & Currah, 1990).

GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE ORQUÍDEA

El proceso de germinación es similar en todas las especies de orquídeas (Arditti, 1992), éste comienza con el hinchamiento del embrión (imbibición) y rompimiento de la testa (estadio 2), el embrión se elonga para formar una estructura globular llamada protocormo (estadio 3) (Harrison, 1977; Leroux *et al.*, 1995) en éste, se forma una depresión en la superficie más alta y los pelos absorbentes comienzan a crecer de la epidermis. Un primordio foliar (estadio 4) emerge de esta depresión a medida que el protocormo sigue creciendo y una segunda (estadio 5) y tercera hoja se forman precedidas por el desarrollo de la raíz (estadio 6). El tiempo requerido para cada uno de estos estadios varía de acuerdo a la especie de orquídea (Knudson, 1922 en Baker *et al.*, 1987) (Tabla 1).

ESTADIO	FIGURA	DESCRIPCIÓN
1		Semilla
2		Semilla hinchada
3		Protocormo
4		Plántula con una hoja
5		Plántula con dos hojas
6		Plántula con raíz verdadera

Tabla 1. Estadios de desarrollo durante la germinación de orquídeas (Harrison & Arditti, 1978).

ASOCIACIÓN MICORRÍZICA DE LAS SEMILLAS DE ORQUÍDEA

Arditti (1992), menciona que Bernard (1909) descubrió de forma accidental que los hongos juegan un papel importante en la germinación de las semillas de orquídea ya que, ésta relación da comienzo a este proceso (Harrison, 1977; Arditti & Ernst, 1984; Leroux et al., 1995) y una vez que la plántula es capaz de fotosintetizar y satisfacer sus propios requisitos energéticos, la asociación simbiótica con el hongo deja de ser necesaria, pero, a pesar de esto, la relación frecuentemente se mantiene (Lesica & Antibus, 1990).

La penetración del hongo, ocurre a través de las células basales del suspensor (Hadley, 1982), el cual consiste de células muertas y es el primer punto de entrada, hacia las células corticales del embrión. La entrada también puede ocurrir a través de las células epidermales. El hongo se expande a las células adyacentes a través de una sola hifa. Esta hifa (filamentos fúngicos) se ramifica, anastomosa, y forma una estructura tridimensional llamada pelotón. En varias capas de las células de la planta puede comenzar la infección, pero algunas porciones de plántulas jóvenes permanecen libres del hongo.

El desarrollo generalmente se da después de que el hongo inicia su establecimiento en el embrión de la orquídea (Arditti, 1992). También se estableció, alrededor del año 1900, que las hifas penetran en los protocormos, y éstas son "digeridas", suministrando a la nueva planta nutrientes y otros materiales (Pierik, 1990).

Pierik (1990), cita que Hadley en 1975 y Harley en 1969, mencionan que los hongos más importantes que tienen relaciones simbióticas con las orquídeas, pertenecen al género *Rhizoctonia*.

GERMINACIÓN SIMBIÓTICA DE LAS SEMILLAS DE ORQUÍDEA

La investigación desarrollada por Knudson alrededor de 1922 provocó una conmoción entre los propagadores y estudiosos de las orquídeas, ya que demostró que las semillas de *Cattleya*, *Laelia*, *Epidendrum*, entre otras, eran capaces de germinar asimbióticamente *in vitro*. A pesar del descubrimiento de Knudson, pronto se pudo comprobar que no siempre era posible obtener un medio de cultivo en el que determinada especie de orquídea pudiese germinar y desarrollarse. Debido a esto, se propusieron diversos medios nutritivos para muchos géneros y especies diferentes (Arditti, 1967; Arditti & Ernst, 1984; Arditti et al., 1982; Pierik, 1990).

El descubrimiento de que las semillas de muchas especies tropicales y subtropicales pueden germinar asimbióticamente en el laboratorio usando medios simples de cultivo para su germinación provee una herramienta que ha sido usada para estudiar la morfología y la fisiología del proceso de germinación y su desarrollo (Smreciu & Currah, 1989; Arditti *et al.*, 1990; St-Arnaud *et al.*, 1992).

EFFECTO DE GLUCOSA Y FRUCTOSA EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE ORQUÍDEAS

Whitner (1988), cita muchos reportes que indican que varias especies de orquídeas germinan y se desarrollan bien en fructosa y glucosa.

Knudson, en 1916, 1922, 1941 y 1950 encontró que los géneros epífitos germinan mejor con la adición de fructosa que con glucosa. En 1922, Knudson logró por primera vez altos porcentajes en la germinación asimbiótica del híbrido *Laelio-Cattleya* con la utilización de glucosa y fructosa en un medio nutritivo con sales minerales y extracto orgánico; así mismo reportó que *Goodyera pubescens* germina con 2% de glucosa; y que *Vanilla planifolia* crece con glucosa si la temperatura es menor a 32°C

Arditti (1967), enlista a varios autores que realizaron estudios con estos carbohidratos: La Garde (1929) y Wynd (1933) reportan que *Cattleya trianaei* se desarrolla bien en glucosa y fructosa. Quednow, en 1930, menciona que dos especies de orquídeas germinan bien en glucosa y fructosa. De la misma forma comenta que Smith (1932), encuentra que glucosa y fructosa usadas separadamente no muestran diferencias en el cultivo. En tanto que, Burgeff (1936), reporto que dentro de los mejores carbohidratos para el cultivo de orquídeas epífitas se encuentran fructosa y glucosa, además recomienda usar una combinación de estos carbohidratos para la germinación de *Paphiopedilum*. Así mismo, Curtis (1939), usó glucosa para la germinación de *Cypripedium*, *Calopogon*, *Goodyera* entre otras.

Por su parte, Withner (1988) cita los trabajos de Downie (1940) en los cuales se reporta que *Goodyera repens* germina mejor con glucosa y fructosa que con sacarosa; así mismo, Noggle y Wynd (1943), encontraron que la glucosa inhibe el crecimiento en un híbrido de *Cattleya*.

Thomale (1954), menciona que glucosa y fructosa son mejores para la germinación de *Paphiopedilum* (Whitner, 1988).

Ernst (1967), reporta que muchas especies de orquídeas germinan y crecen mejor en fructosa que en glucosa, por ejemplo las plántulas de *Phalaenopsis* toman la fructosa con mayor preferencia que la glucosa.

Por otro lado, Harrison y Arditti (1978), reportan que *Cattleya aurantiaca* no tiene un buen desarrollo en un medio con fructosa; sin embargo, se obtiene un buen desarrollo al utilizar glucosa como fuente de carbono.

Ernst y Arditti (1990), evaluaron la germinación y el desarrollo de plántulas de "*Phalaenopsis* Harburg" y "*Phalaenopsis* Ruth Burton" utilizando glucosa y otros maltooligosacáridos; dónde encontraron que la absorción del azúcar disminuye moderadamente con el peso molecular de los oligómeros. Es decir, las plántulas que tenían un aporte de oligómero de alto peso molecular sólo producían unas cuantas hojas y raíces. La glucosa puede mantener un buen crecimiento en comparación con la maitosa.

Leroux y colaboradores (1995), utilizaron glucosa al 1.9% para la germinación de *Cypripedium acaule* obteniendo un buen desarrollo de las plántulas.

REQUERIMIENTOS TEMPORALES DE LOS CARBOHIDRATOS AL INICIO DE LA GERMINACIÓN.

La inhabilidad de los embriones de orquídeas para convertir sus reservas lipídicas en carbohidratos, puede explicar el requerimiento de un suplemento exógeno de carbohidratos simples solubles para que la semilla germine (Harrison & Arditti, 1978). Además, la disponibilidad de diferentes fuentes exógenas de carbono, son necesarias para la germinación de semillas de orquídea y el temprano desarrollo de las plántulas bajo condiciones simbióticas o asimbióticas, por lo menos hasta que las plantas comiencen a ser autótrofas. Dicho proceso no ha sido completamente investigado (Tsuitsui & Tomita, 1990).

Harrison y Arditti (1978), realizaron experimentos sobre el efecto de los carbohidratos en semillas de *Cattleya aurantiaca* utilizando como fuente de carbohidratos: sacarosa, glucosa y fructosa, encontraron que el tiempo de exposición al carbohidrato no es indefinido; ya que después de 21 días sobre sacarosa el 13% de las semillas hinchadas y protocormos que se transfirieron a un medio sin carbohidrato formaron plántulas. El 50% de los protocormos transferidos a un medio sin carbohidrato, produjeron hojas después de haber permanecido de 28 a 30 días en un medio con carbohidrato; y después de 47 días de estar en un medio con carbohidrato el 92% de los protocormos continuaron su desarrollo. Concluyen que en general, el porcentaje de protocormos que formaron hojas fue directamente proporcional al tiempo que se mantuvieron sobre un medio con carbohidrato.

EFFECTO DE LOS CARBOHIDRATOS SOBRE LA RESPUESTA MORFOGÉNICA DURANTE EL PROCESO DE GERMINACIÓN DE *Laelia*.

Hasta el momento se cuenta con escasos estudios sobre el efecto de glucosa, fructosa y de otros carbohidratos en la germinación y el desarrollo del género *Laelia*.

Knudson (1922), obtiene la germinación asimbiótica del híbrido *Laelio-Cattleya* utilizando glucosa y fructosa en un medio nutritivo suplementado con minerales y extracto orgánico (Whitner, 1988). Luna y Cosmes (1989), reportan un mejor desarrollo ontogénico del embrión de *Laelia speciosa* al utilizar 1.5% de sacarosa en dos medios nutritivos obteniendo plántulas completas. Luna y Barba (1993), reportan que al utilizar fructosa y glucosa como fuente de carbono para la germinación de *Laelia speciosa* se induce el desarrollo morfológico de los embriones, sin embargo en glucosa es más rápido con respecto a la fructosa y las concentraciones que favorecen el desarrollo hasta el estadio de plántula se encuentran en el rango del 3 al 5%.

Stancato y Faria (1996), realizaron un experimento con plántulas de *Laelia cinnabarina* para evaluar el efecto de varios medios de cultivo suplementados con 20 g/l de sacarosa y reportaron que posiblemente ésta especie muestra una correlación entre la acumulación de peso seco y la disponibilidad de nutrientes *in vitro*. Velázquez (1997), reporta que bajas concentraciones (1, 3 y 5%) de glucosa y fructosa estimulan la germinación de *Laelia speciosa*.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Laelia speciosa*.

El género *Laelia* fue descrito por John Lindley en 1831 en su obra "Género y Especies de Plantas de Orquídea" y este nombre se ha conservado actualmente (Bechtel *et al.*, 1986). La característica principal que distingue a todas las especies de *Laelia* es que las flores tienen ocho polinios comparado con los cuatro polinios que tienen las flores del género más cercano, *Cattleya*. Algunos de los sinónimos que recibe *Laelia speciosa* son: *Laelia grandiflora* (La Llave & Lexarza) Lindley, *Laelia majalis* Lindley, *Cattleya grahamii* Lindley. Se le conoce comúnmente como "flor de mayo", "flor grande", "flor de corpus", "tlacuxóchitl", "deantza", "itzamahua" y "chichiltictopetzacuxóchitl" (Halbinger, 1993).

Laelia speciosa es una de las primeras orquídeas mexicanas que se citan en la literatura científica. Se le considera como una de las más bellas especies del género y quizá una de las más notables de todas las orquídeas. Las plantas son epífitas, con pseudobulbos globosos u ovoides (Halbinger, 1993) miden de 6 cm de alto y cada uno presenta 3 hojas apicales de 20 cm de largo (Wiard, 1987). La inflorescencia puede medir de 12 a 20 cm de largo y pueden contener de 1 a 2 flores que miden de 10 a 15 cm de diámetro (Fig. 1). El color de las flores va del rosa-lila claro hasta lila oscuro (Halbinger, 1993), con puntos lavanda sobre la base del labelo blanquecino (Wiard, 1987), tienen una tenue fragancia semejante a la de las violetas. Su época de floración es de abril a julio. (Halbinger, 1993). La fructificación también es estacional, se inicia en la época de secas y su proceso de desarrollo y maduración abarca 10 meses (Hernández, 1992).

Laelia speciosa puede encontrarse en un territorio muy extenso de México, en los estados de Durango, Zacatecas, Aguascalientes, Jalisco, Guanajuato, Michoacán, Querétaro, Hidalgo, San Luis Potosí y Tamaulipas (Soto, 1990; Halbinger, 1993).

Es una de las orquídeas más tolerante a las sequías, crece sobre encinos en bosques caducifólios, achaparrados y abiertos en altitudes que van de 1900 a 2500m (Halbinger, 1993).

Es importante hacer notar que durante el período de floración, las flores son muy conspicuas por la ausencia de follaje en los encinos, de tal manera que son visibles a sus polinizadores y colectores (Hernández, 1992).

Esta especie es una de las orquídeas más ampliamente colectada en México, se vende en grandes cantidades en el mercado y calles de esta capital (Soto, 1990); aunque todavía existen localidades con un gran número de plantas, algunos sitios han sido tan explotados que las plantas casi se han extinguido localmente (Halbinger, 1993), su *status* de conservación es "vulnerable". En esta categoría de acuerdo con la UICN se incluyen los taxa que presentan poblaciones en decremento debido a la sobreexplotación y la destrucción o perturbación extensiva del hábitat (Soto, 1990; Soto & Hagsater, 1990).

Antiguamente, y hasta la fecha el pseudobulbo de *Laelia speciosa* se usa en la fabricación de dulces durante los festejos de Día de Muertos en el estado de Michoacán (Peña & Peña, 1981).

Taxonómicamente el género *Laelia* esta cercanamente unido a *Cattleya* y *Epidendrum* (Bechtel *et al.*,1986). Cronquist (1981) y Dressler (1993) proponen la siguiente clasificación taxonómica para *Laelia speciosa*:

Reino: Vegetal

División: Spermatophyta

Subdivisión: Angiospermae

Clase: Liliopsida

Subclase: Liliidae

Orden: Orchidales

Familia: Orchidaceae

Subfamilia: Epidendroideae

Tribu: Epidendreae

Subtribu: Laelinae

Género: *Laelia*

Especie: *Laelia speciosa* (H.B.K). Schitr

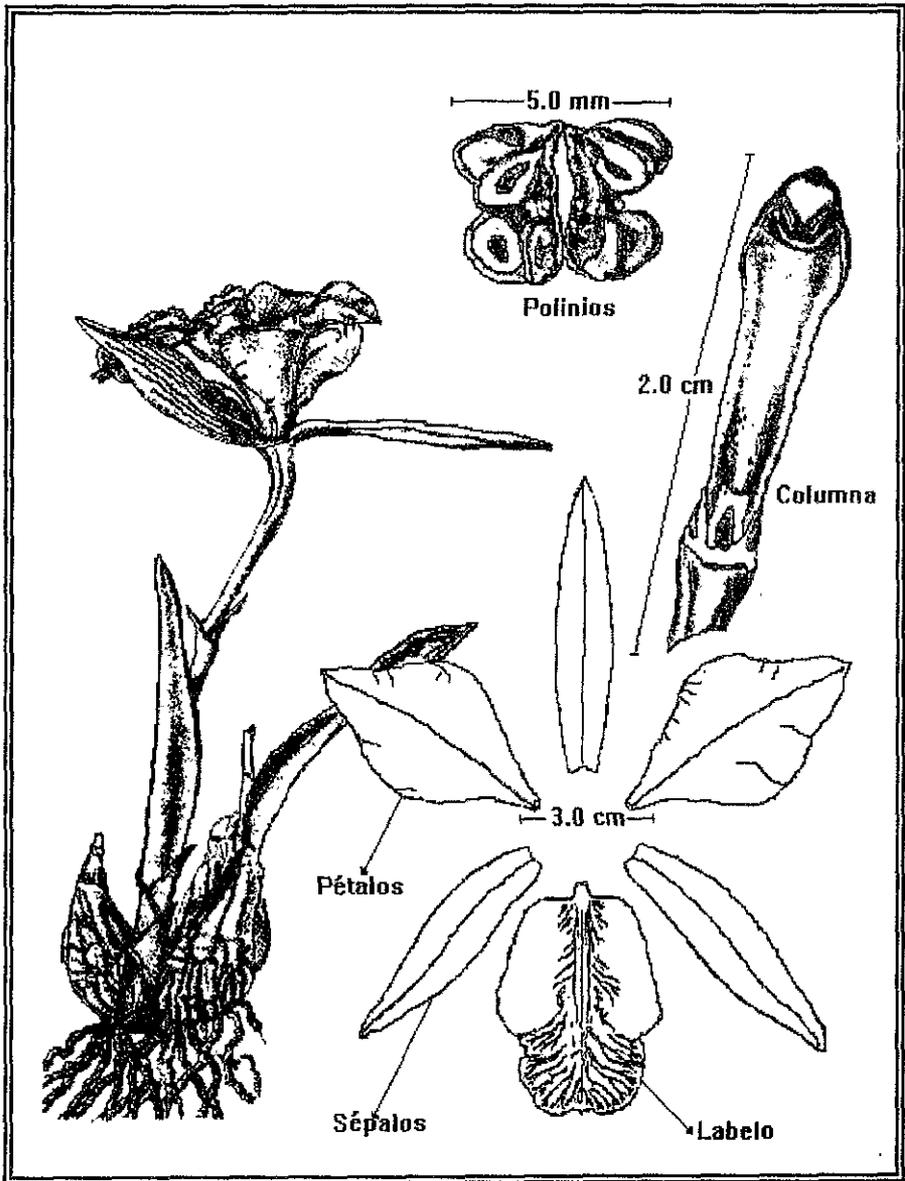


Fig. 1. Planta de *Laelia speciosa* (modificado de Halbinger, 1993).

OBJETIVOS

GENERAL:

- Determinar el efecto a la exposición limitada de fructosa y glucosa al inicio y durante la germinación *in vitro* de semillas de *Laelia speciosa*.

PARTICULARES:

- Determinar la viabilidad de las semillas de *Laelia speciosa*.
- Establecer la diferencia de respuesta morfogénica del embrión durante su germinación asimbiótica sobre fructosa y glucosa.
- Determinar el tiempo mínimo requerido del estímulo con fructosa y glucosa para inducir la respuesta morfogénica del embrión.
- Evaluar el porcentaje de plántulas con al menos una raíz verdadera (estadio 6), en cada carbohidrato a los 98 días de iniciada la siembra.

HIPÓTESIS

El embrión de las orquídeas requiere de un estímulo para continuar su desarrollo morfogénico durante el proceso de germinación, pero si se suspende el estímulo dado por la fructosa y la glucosa en algún momento determinado del proceso, el embrión podrá continuar su desarrollo hasta finalizarlo.

METODOLOGÍA

MATERIAL BIOLÓGICO: Se emplearon semillas de *Laelia speciosa* que se colectaron de tres frutos provenientes de la localidad de Coenembo, Michoacán. Se procuró coleccionar frutos indehiscentes de color verde amarillento sin rastro de la presencia de hongos y bacterias. Estos se colocaron en bolsas de papel de estraza para su transporte. Ya en el laboratorio, se almacenaron en frascos tapados con una malla de muselina, y se colocaron en un desecador con cloruro de calcio anhidro, para mantener las semillas viables por largos períodos de tiempo (Thompson, 1980).

PRUEBA DE VIABILIDAD: Esta prueba se realizó por el método bioquímico del TTC (2,3,5-trifenil-tetrazolio) desarrollado por Låkon en 1949. Para la prueba se eligieron tres frutos maduros de diferentes plantas (con el fin de utilizar el que tuviera mayor porcentaje de semillas viables) de los cuales se obtuvieron dos lotes de 50 semillas los que se colocaron en sobres de papel filtro (2x2 cm) y estos se sumergieron en etanol al 70% durante 5 minutos; posteriormente, se transfirieron a una solución de hipoclorito de sodio al 0.6% de cloro disponible (CLOROX 6% de cloro activo al 10% v/v) durante 10 min, con la finalidad de tener una mayor permeabilidad de la testa al TTC. Después de esto se procedió a enjuagar los sobres tres veces con agua destilada para colocarlos en la solución de TTC al 1% durante 24 horas en la oscuridad, a una temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Transcurrido este tiempo se realizaron tres enjuagues y finalmente se mantuvieron en agua destilada.

Las semillas de cada sobre se observaron bajo el microscopio estereoscopio, se tomaron al azar dos lotes de 50 y se registraron las que estaban teñidas para posteriormente calcular el porcentaje de viabilidad mediante un rango de tolerancia máximo establecido de acuerdo a Moreno (1984).

GERMINACIÓN *IN VITRO*.

MEDIO DE CULTIVO: La germinación asimbiótica *in vitro* de las semillas de *Laelia speciosa* se llevó a cabo en el medio de cultivo Murashige-Skoog (MS)(Tabla 2, anexo) para lo cual se empleó una mezcla de sales básicas marca SIGMA.

Carbohidratos experimentales: Los carbohidratos que se emplearon como fuente de carbono y energía para la germinación asimbiótica de semillas de *Laelia speciosa* fueron fructosa y glucosa. Estos carbohidratos se añadieron por separado al medio MS a una concentración de 3%; se realizaron 45 réplicas para cada carbohidrato, los cuales se esterilizaron por dos métodos: autoclave (A) y filtración (F) (Tabla 3).

Ajuste del pH: Una vez preparado el medio de cultivo (MS), se ajustó el pH a 5.7 con la adición de ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH), según fue necesario.

Esterilización en autoclave: Los carbohidratos (fructosa y glucosa) se adicionaron por separado al medio de cultivo (MS). Una vez preparado, se vertieron 15 ml del medio de cultivo a tubos de ensaye, estos se esterilizaron en autoclave bajo condiciones estándar de 1 atm de presión y a una temperatura de 121°C, durante 15 minutos (Abraham & Vatsala, 1981; Han & Stephens, 1992).

Esterilización en frío: El medio de cultivo (MS) sin carbohidrato se esterilizó en autoclave, mientras éste permanecía líquido se inyectó el carbohidrato previamente disuelto con la ayuda de una jeringa hipodérmica acoplada a un filtro de membrana de 0.45µ de este modo se retienen los contaminantes (Abraham & Vatsala, 1981). Posteriormente, el medio de cultivo con carbohidrato se mezcló bien y se distribuyó en los tubos de ensayo previamente esterilizados (aprox. 15 ml/tubo). Todo este proceso se realizó dentro de la cámara de flujo laminar.

DESINFESTACIÓN Y SIEMBRA: La siembra se llevó a cabo en una sala previamente esterilizada con luz UV, la superficie de la campana de flujo laminar y todo material que se introdujo a ella se desinfectó con etanol al 70%.

La desinfección de las semillas se efectuó con cuidado y esmeradamente antes de introducir las al medio, para eliminar de la superficie esporas y bacterias adquiridas del ambiente (Abraham & Vatsala, 1981).

Para la siembra se colocaron 50 semillas dentro de sobres de papel filtro (2x2 cm), estos se desinfectaron con una solución de etanol al 70% durante 5 minutos, posteriormente se transfirieron a una solución de hipoclorito de sodio al 10% v/v (0.6% de cloro activo) durante 10 minutos, pasado este tiempo se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se colocó un sobre en cada tubo con medio de cultivo.

INCUBACIÓN: Los tubos con el material biológico se colocaron en la sala de incubación donde se mantuvieron a una temperatura de 25°C ± 2°C y un fotoperíodo de 16 horas luz, con una iluminación de 4670 lux, utilizando seis lámparas fluorescentes de 75 watts.

DISEÑO EXPERIMENTAL

EFFECTO DEL ESTÍMULO LIMITADO DE FRUCTOSA Y GLUCOSA AL INICIO DE LA GERMINACIÓN: Cada cinco réplicas en los dos tipos de carbohidratos esterilizados por filtración y en autoclave se transfirieron a un medio MS sin carbohidrato a diferentes tiempos de iniciado el cultivo: 7, 15, 21, 30, 38, 45, 52 y 60 días, a excepción de cinco réplicas que permanecieron bajo el estímulo del carbohidrato durante 98 días (testigo) (tabla 3). Lo que permitió evaluar la respuesta del efecto del estímulo limitado por fructosa y glucosa así como también determinar el tiempo mínimo requerido del estímulo de estos carbohidratos para inducir la respuesta morfogénica del embrión durante su germinación. Se consideró como tiempo mínimo cuando se obtuvo más de 50% de plántulas desarrolladas (estadios 4 al 6).

TIPOS DE TRATAMIENTO CON FRUCTOSA Y GLUCOSA				
Tiempo de exposición (días)	FA	FF	GA	GF
7	*5	*5	*5	*5
15	*5	*5	*5	*5
21	*5	*5	*5	*5
30	*5	*5	*5	*5
38	*5	*5	*5	*5
45	*5	*5	*5	*5
52	*5	*5	*5	*5
60	*5	*5	*5	*5
98	*5	*5	*5	*5

Tabla 3. Diseño experimental para *Laelia speciosa*. FA (fructosa esterilizada en autoclave), FF (fructosa esterilizada por filtración), GA (glucosa esterilizada en autoclave), GF (glucosa esterilizada por filtración), *5 (tamaño de la muestra).

PORCENTAJE DE GERMINACIÓN: El porcentaje de germinación se evaluó cada 7 días hasta los 98 días después de iniciada la siembra; se cuantificó mediante el porcentaje total de semillas que se encontraran en cualquier estadio a partir de semilla hinchada. Este porcentaje permitió conocer la velocidad de la germinación a través del tiempo en cada una de sus réplicas y a su vez estimar en forma directa la viabilidad de las semillas.

ÍNDICE DE DESARROLLO: La diferencia de respuesta morfogénica del embrión durante su germinación se evaluó para cada tipo de carbohidrato mediante el índice de desarrollo. Para esto, se registró el desarrollo del embrión cada 7 días hasta los 98 días de acuerdo al método empleado por Harrison y Arditti (1978). Se asignó un valor a cada estadio de desarrollo (Tabla 1), el índice de desarrollo se calculó para cada réplica, al emplear la frecuencia de cada valor expresado como un porcentaje del número total de individuos, estos porcentajes se multiplicaron por el valor asignado a sus respectivos estadios, finalmente se sumaron y el total fue considerado como el valor del índice de desarrollo. Además, se registró el porcentaje de plántulas en el último estadio (plántula con raíz verdadera) a los 98 días.

DISEÑO ESTADÍSTICO: A los resultados obtenidos de índice de desarrollo y porcentaje de germinación se les aplicó un ANDEVA con un intervalo de confianza de 0.05%, para establecer si existían diferencias entre las interacciones de los tipos de carbohidratos empleados, métodos de esterilización de los carbohidratos y tiempos de exposición a los mismos. Para esto se utilizó el programa estadístico SAS versión 6.08.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VIABILIDAD

Las semillas usadas en este estudio fueron obtenidas de una planta heterocigótica colectada de una población natural, de acuerdo a esto, los grupos de semillas pueden responder diferente a los tratamientos fisiológicos que se les dé (Miyoshi & Mii, 1995). Shoushtari y colaboradores (1994), mencionan que la viabilidad varía con la especie, híbrido y tiempo de almacenaje.

La prueba de viabilidad permitió estimar de manera rápida la condición biológica de la semilla, se basa en la reacción de ciertas enzimas de las células vivas con la sal de este reactivo, donde se da la reducción del tetrazolio formándose un compuesto rojo llamado formazán (Moreno, 1984).

De las semillas a las que se les aplicó la prueba de viabilidad, el máximo porcentaje registrado fue de 88% de embriones teñidos (fruto 2) (Tabla 4), donde el rango de coloración varió del rojo, anaranjado y rosa. Lo cual concuerda con lo reportado por Shoushtari y colaboradores (1994), quienes mencionan que el cloruro de tetrazolio tiñe a los embriones viables de naranja o naranja rojizo.

Por otro lado, Ramsay (com. pers. 1997) menciona que si el porcentaje de viabilidad en un fruto está por arriba del 50 % se considera aceptable. Las diferencias en los porcentajes de viabilidad obtenidos en los frutos de *Laelia speciosa* quizá se deban a la condición biológica de la planta donadora.

FRUTO	(%)
1	51
2	88
3	87

Tabla 4. Porcentaje de semillas viables de *Laelia speciosa*.

PORCENTAJE DE GERMINACIÓN

El primero en describir el proceso de germinación en orquídeas fue Knudson (1922), quien reporta que en general el proceso comienza con un ensanchamiento del embrión hasta que alcanza el estadio de una pequeña esférula y los pelos absorbentes crecen de la epidermis; la esférula aumenta de tamaño y forma una masa globular de células con una depresión en la superficie más alta (protocormo); el protocormo continúa creciendo y un *primordio foliar emerge de esta depresión, posteriormente, una segunda y tercera hoja se forman precediendo al desarrollo de la raíz* (Baker *et al.*, 1987).

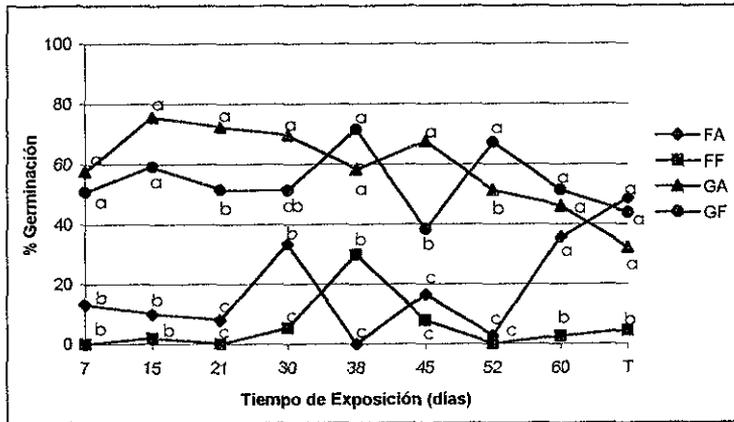
Pierik en 1990, cita que Arditti (1967), Harley (1969), y Pierik *et al.*, (1982, 1983) consideran que la germinación de las semillas de orquídea tiene lugar de la siguiente forma: El embrión absorbe agua a través de la testa, aumentando de volumen. Después se inicia la *división celular, rompiendo el embrión la cubierta seminal. A continuación se forma una estructura de tipo protocormo, a partir del agregado de células, y sobre éste puede distinguirse el meristemo del vástago. Tan pronto como se inicia la diferenciación de órganos (meristemo del vástago en el ápice y rizoídes en la base), comienza un período de crecimiento intenso. Si el protocormo está a la luz, adquiere el color verde y al mismo tiempo se desarrollan hojas. Como resultado de la formación de la clorofila la planta se hace autótrofa y más tarde las raíces verdaderas se forman endógenamente.*

De Pauw y Remphrey (1992), consideran el inicio del proceso de germinación cuando el embrión emerge de la testa. Otros autores como Harrison y Arditti (1978), Nishimura (1981), Baker y colaboradores (1987), Rubluo y colaboradores (1989), Leroux y colaboradores (1995), consideran el inicio de la germinación en orquídeas, cuando el embrión se agranda hasta formar un protocormo. Masuhara y Katsuya (1989), así como también Zettler y McInnis (1993), mencionan que este proceso da inicio cuando la testa es rota o desgarrada debido al ensanchamiento del embrión.

Dado que, existen diversas interpretaciones del momento en que se inicia la germinación de las semillas de orquídeas, en este trabajo se consideró que la semilla ha germinado, cuando el embrión se hincha y toma una coloración verde.

El primer signo de germinación en las semillas de *Laelia speciosa*, se observó a partir de los 7 días de iniciada la siembra; donde se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) (Tabla 7) en las interacciones de las variables experimentales, obteniéndose un mayor porcentaje de germinación en las semillas expuestas a glucosa (Gráfica 1). Al respecto Arditti (1992), menciona que la germinación de las orquídeas puede iniciarse entre los 7 y 235 días después de que las semillas son colocadas en cualquier tipo de medio.

Laelia es uno de los géneros más cercanos a *Cattleya*, por lo cual se podría esperar un comportamiento similar; en la respuesta de germinación *in vitro*. Sin embargo, Baker et al., (1987), reportan que este género germina aproximadamente en dos semanas. Esta diferencia observada, concuerda con lo reportado por Arditti y colaboradores (1982), quienes mencionan que los requerimientos de carbohidrato para la germinación varían aún dentro de especies y géneros que pertenecen a la misma familia.



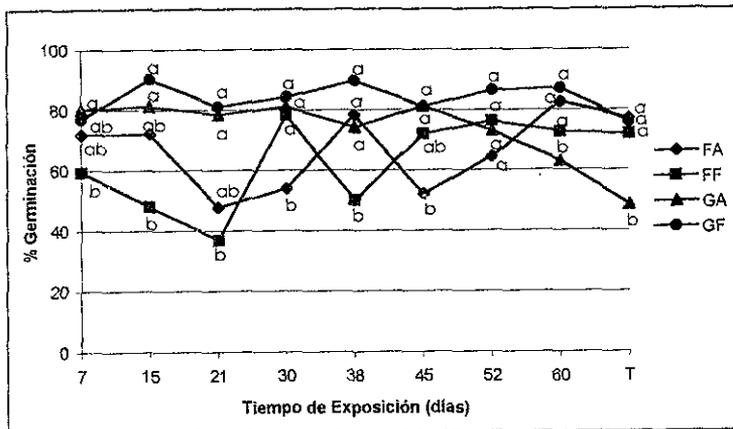
Gráfica 1. Efecto del estímulo limitado por fructosa y glucosa en la germinación de *Laelia speciosa* a los 7 días de cultivo. FA: fructosa en autoclave, FF: fructosa por filtración, GA: glucosa en autoclave, GF: glucosa por filtración, T: testigo

Los valores marcados con letras diferentes denotan diferencias significativas

A los 21 días de cultivo existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$) (Tabla 7) entre las interacciones de las variables experimentales (Gráfica 2). Se observó que el porcentaje de germinación de las semillas continúa aumentando, aún en aquellas que ya no estaban expuestas al estímulo de los carbohidratos (tiempos de exposición 7 y 15).

Esta respuesta es más rápida comparándola con *Cattleya aurantiaca* la cual requiere para este proceso de 20 a 60 días del estímulo de fructosa y glucosa (Harrison & Arditti, 1978).

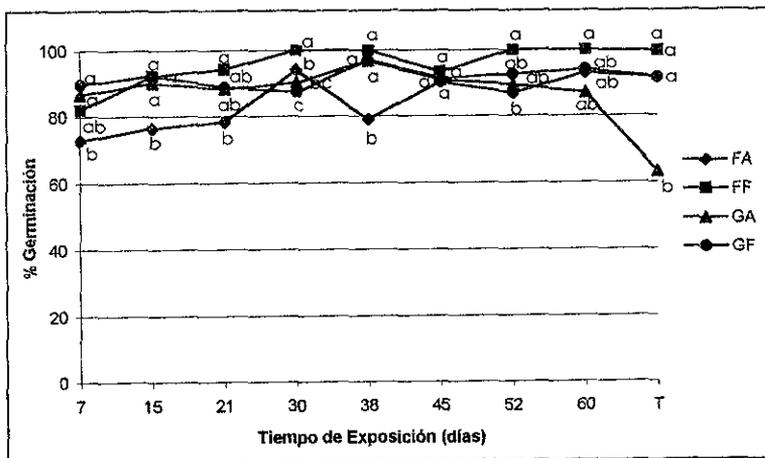
Lo mismo ocurre al compararla con otras especies como: *Ponthiera racemosa* cuyas semillas germinan en dos meses (Baker et al., 1987); *Cyripedium japonicum* requiere de tres meses para germinar y *C. debile* requiere más de tres meses para hacerlo (Hoshi et al., 1994); de modo similar, *C. acaule* germina después de los seis meses de incubación (St-Arnaud et al., 1992).



Gráfica 2. Efecto del estímulo limitado por fructosa y glucosa en la germinación de *Laelia speciosa* a los 21 días de cultivo

Los valores marcados con letras diferentes denotan diferencias significativas

A partir de los 42 días y hasta el final del cultivo el porcentaje de germinación no varió y no existieron diferencias significativas en las interacciones de las variables experimentales (Tabla 7). Al final del cultivo, 98 días, el máximo porcentaje de germinación que se obtuvo, en aquellas semillas que estuvieron expuestas durante 38 días al estímulo de GA y GF, fue de 97%. Para aquellas que estuvieron expuestas por más de 30 días sobre FF el porcentaje de germinación fue de 100, a excepción de las que se mantuvieron bajo el estímulo durante 45 días; y en las semillas que estuvieron expuestas sobre FA al estímulo de 38 días, fue de 94% (Gráfica 3). La germinación no se ve afectada por el carbohidrato, el tipo de esterilización ni el tiempo de exposición.



Gráfica 3. Efecto del estímulo limitado por fructosa y glucosa en la germinación de *Laelia speciosa* a los 98 días de cultivo.

Los valores marcados con letras diferentes denotan diferencias significativas

Bajo condiciones naturales escasamente del 1 al 2% de las semillas germinan (Philip & Nainar, 1988); así mismo, la mortalidad de las semillas de orquídea durante la germinación es extremadamente alta (Baker *et al.*, 1987). Hernández (1992), reporta que en la naturaleza *Laelia speciosa* presenta un porcentaje de germinación extremadamente pobre que va de 0.000048 hasta 0.00022.

Sin embargo bajo condiciones asimbióticas las tasas de germinación son cercanas al 100 %. Lo anterior corrobora los resultados obtenidos en esta especie ya que el porcentaje promedio de germinación al término del cultivo fue de 89%.

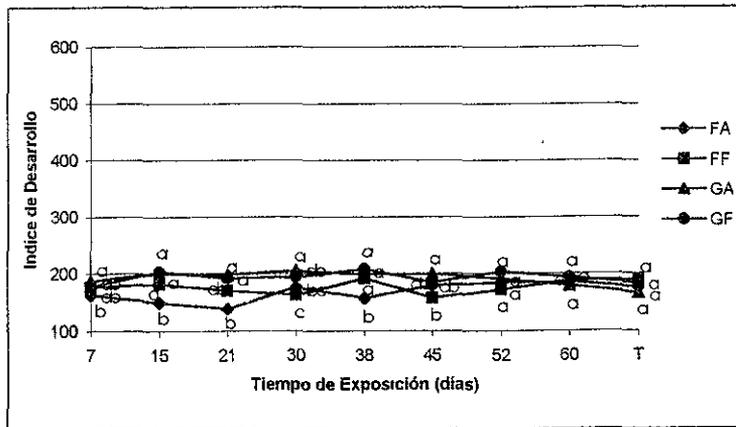
Moreno (1984), menciona que el porcentaje de viabilidad obtenido en la prueba de tetrazolio, es el porcentaje de germinación que se esperaría cuando el lote es germinado bajo condiciones muy favorables. Lo cual concuerda con el porcentaje de viabilidad y de germinación obtenidos para *L. speciosa* los cuales fueron de 88% y 89% respectivamente, esta diferencia se ubica dentro del rango de diferencia permitida que puede considerarse dentro del error debido al muestreo.

En este estudio la fructosa esterilizada por filtración y la glucosa esterilizada por ambos métodos resultaron ser una buena fuente de carbohidrato para inducir la germinación de las semillas de *Laelia speciosa*, ya que se obtuvieron altos porcentajes de germinación lo cual concuerda con otros estudios como los realizados por, Leroux *et al.*, (1995) quienes citan que Whitner (1959), Arditti (1967) y Ernst (1967), observaron que las semillas de orquídea germinan en presencia de fructosa. Arditti (1982), menciona que algunas orquídeas germinan mejor sobre medios que contengan glucosa y/o fructosa o miel de abeja, como es el caso de *Goodyera pubescens* la cual germina bien sobre glucosa mientras que *Paphiopedilum* lo hace sobre fructosa.

ÍNDICE DE DESARROLLO

El primer signo de desarrollo, semilla hinchada, fue evidente a partir de los siete días de iniciada la siembra, con el estímulo de ambos carbohidratos; y a los 14 días de cultivo la mayoría de las semillas alcanzaron este estadio. En estos tiempos de cultivo existieron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) (Tabla 8) en las interacciones de las variables (tipo de carbohidrato, tiempo de exposición y tipo de esterilización).

A los 21 días de cultivo, no existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$) (Tabla 8) en las interacciones. Sin embargo, las semillas que estuvieron y permanecieron bajo el estímulo de glucosa esterilizada por ambos métodos alcanzan el estadio de semilla hinchada (I.D. 200) (Gráfica 4). Para que *L. speciosa* alcanzara este índice de desarrollo necesitó de 11 días más que las semillas de *Cattleya aurantica*, cuando estas estuvieron expuestas a un medio con sacarosa. Lo que coincide con lo reportado por Arditti y colaboradores (1982), quienes mencionan que en general se habla de carbohidratos genéricamente sin señalar la importancia del tipo, y que los requerimientos de carbono varían dentro de las especies y los géneros de la misma familia.



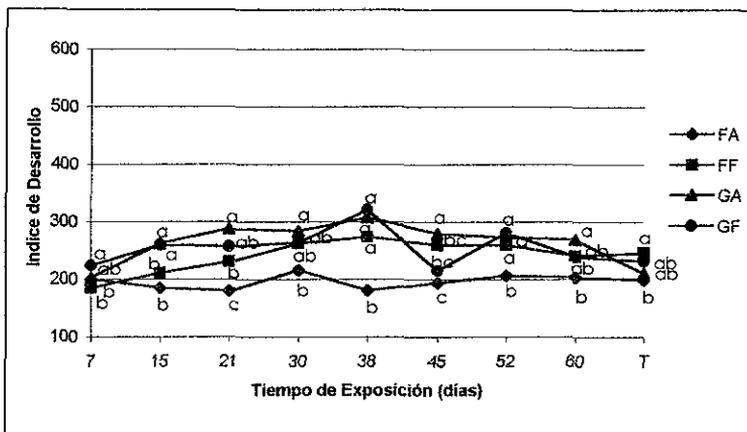
Gráfica 4. Efecto del estímulo limitado por fructosa y glucosa en el desarrollo de *Laelia speciosa* a los 21 días de cultivo. FA: fructosa en autoclave, FF: fructosa en filtración, GA: glucosa en autoclave, GF: glucosa en filtración, T: testigo

Los valores marcados con letras diferentes denotan diferencias significativas

Harrison y Arditti (1978), reportan que después de que las semillas de *Cattleya aurantiaca* han alcanzado el estadio de semilla hinchada, requieren aproximadamente de 18 días para llegar al estadio de protocormo (I.D. 300). Para las semillas de *Laelia speciosa* que estuvieron expuestas al estímulo GA y GF durante 38 días (Gráfica 5), dicho estadio se alcanzó después de 21 días. Aquellas semillas expuestas a FA alcanzaron, a los 42 días de cultivo, el estadio de semilla hinchada; mientras que, la mayoría de las semillas expuestas al estímulo de fructosa esterilizada por filtración alcanzaron el estadio de protocormo.

A partir de este tiempo y hasta los 63 días de cultivo existieron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) (Tabla 8) en las interacciones de las variables experimentales y a partir de los 70 días y hasta el final del cultivo no existen diferencias significativas.

St- Arnaud *et al.*, (1992) y Leroux *et al.*, (1995), citan a Ernst (1967), Ernst *et al.*, (1970, 1971) quienes observaron que en un cultivo asimbiótico, los embriones de las orquídeas pueden pasar del estadio de protocormo al estadio de plántula con una fuente adecuada de glúcidos simples. Sin embargo, aún cuando a las semillas y protocormos de *Laelia speciosa* se les expuso al estímulo durante siete y 15 días con fructosa y glucosa, no logran continuar su desarrollo (Gráfica 5); esto quizá se deba a que el estímulo por los carbohidratos no fue suficiente para inducir una respuesta morfogénica en los embriones.

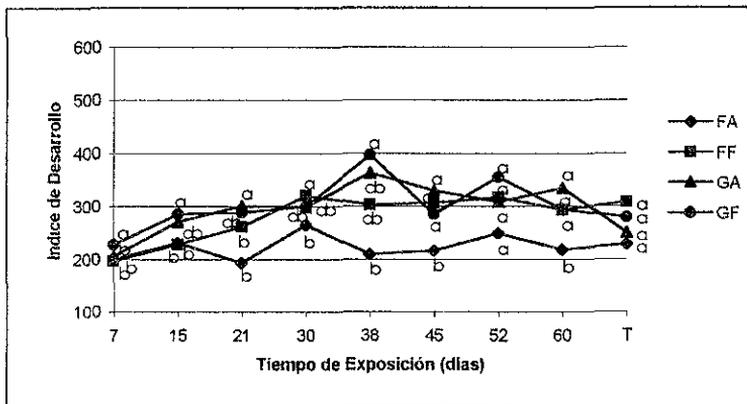


Gráfica 5. Efecto del estímulo limitado por fructosa y glucosa en el desarrollo de *Laelia speciosa* a los 42 días de cultivo.

Los valores marcados con letras diferentes denotan diferencias significativas

A los 56 días de cultivo los protocormos que estuvieron bajo el estímulo de GF durante 38 días, son los primeros en alcanzar el estadio de plántula con una hoja (I.D. 400) (Gráfica 6). Estos resultados indican que el efecto del estímulo de la glucosa esterilizada por filtración, para inducir la respuesta morfogénica de protocormo a plántula con una hoja, en *L. speciosa* es limitado.

La mayoría de las semillas y protocormos que han estado y que permanecieron con el estímulo de GA y FF permanecieron en estadio de protocormo. En tanto que algunas de las semillas expuestas al estímulo de FA estarían alcanzando el índice de desarrollo de 300.

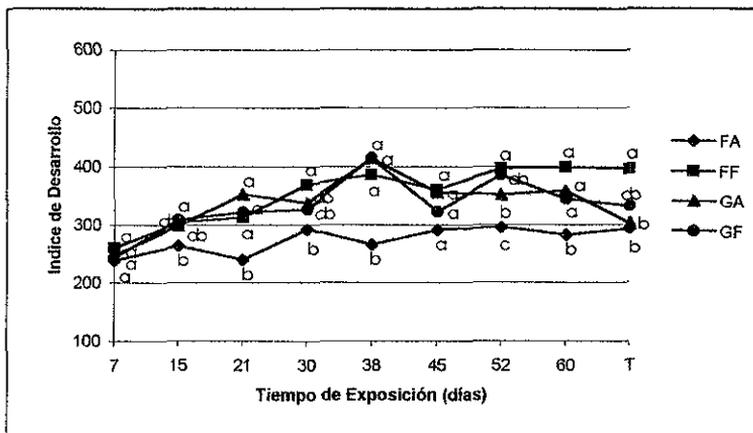


Gráfica 6. Efecto del estímulo limitado por fructosa y glucosa en el desarrollo de *Laelia speciosa* a los 56 días de cultivo.

Los valores marcados con letras diferentes denotan diferencias significativas

Al término del cultivo (98 días) (Gráfica 7), los protocormos que estuvieron bajo el estímulo de FF más de 38 días, alcanzan el estadio de plántula con una hoja, a excepción de aquellos que se expusieron durante 45 días; y sólo las de GA que se expusieron durante 38 días alcanzan este estadio (I.D. 400). Mientras que, las semillas que se expusieron al estímulo de GF permanecen en este índice.

Por otro lado, las semillas que estuvieron expuestas a fructosa esterilizada en autoclave no alcanzan el índice de desarrollo de 300. Esto probablemente se deba a que la esterilización en calor del medio de cultivo descompone a la fructosa (103-105°C), la cual se descompone a temperaturas menores a las que se alcanzan durante la esterilización en autoclave. También se observó que las semillas y protocormos de *L. speciosa* trasplantados a los 7 y 15 días a un medio sin fructosa y glucosa no logran pasar del estadio de protocormo.



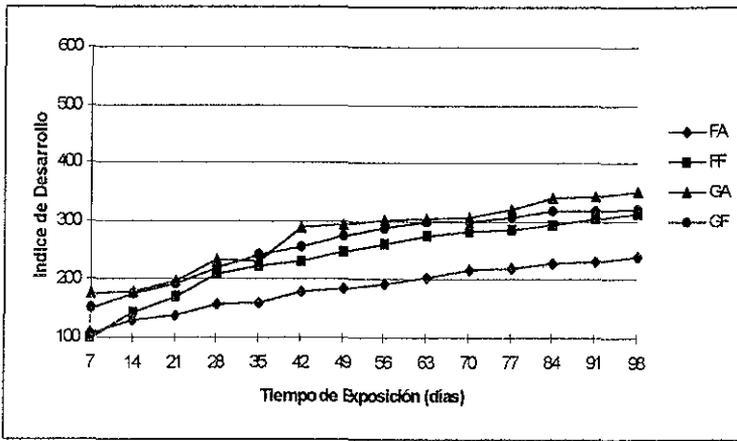
Gráfica 7. Efecto del estímulo limitado por fructosa y glucosa en el desarrollo de *Laelia speciosa* a los 98 días de cultivo.

Los valores marcados con letras diferentes denotan diferencias significativas

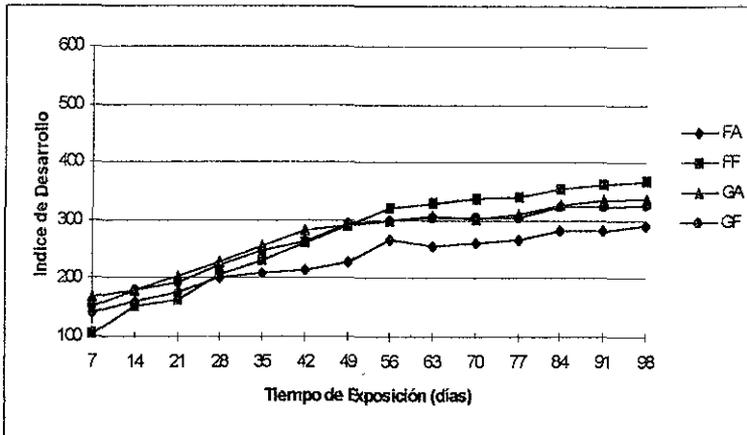
Es importante señalar que el índice de desarrollo alcanzado por los embriones en un tiempo determinado de cultivo o de exposición al estímulo indicaría la presencia de un sólo estadio; sin embargo, a lo largo del cultivo se presentaron estadios más avanzados a los indicados por el máximo índice de desarrollo calculado (I.D. 400); es decir, que también se desarrollaron plántulas con hojas y con raíz verdadera.

El estímulo durante 7 y 15 días sobre cualquiera de los carbohidratos no indujeron una respuesta morfológica de los embriones ya que no rebasan el estadio de protocormo (I.D.300) después de 98 días de cultivo (Gráfica 7). Esta respuesta probablemente se debe que el estímulo de los carbohidratos no fue suficiente y a que las semillas no presentan órganos capaces de efectuar la gluconogénesis. Así mismo, el estímulo de fructosa esterilizada por autoclave no induce una respuesta morfológica de los embriones en ninguno de los tiempos de exposición (Gráfica 7). Esto quizá se debe a que la fructosa se descompone y por lo tanto no está disponible para los embriones ya que el carbohidrato es el factor limitante para inducir la respuesta morfológica.

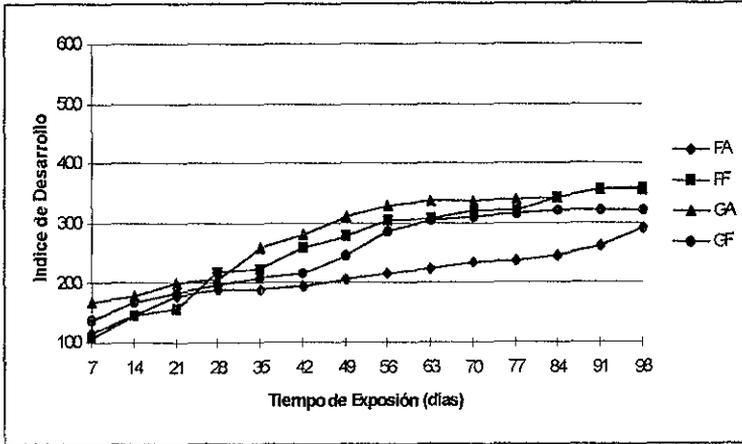
La exposición al estímulo durante 21 días induce una respuesta morfológica a partir de los 70 días de cultivo (Gráfica 8); en tanto que a la exposición de 30 y 45 días al estímulo está respuesta se observa a partir de los 56 días de cultivo, ya que se rebasa el índice de desarrollo de 300 (estadio de protocormo); el cual indica la presencia de estadios más avanzados (Gráficas 9 y 10).



Gráfica 8. Efecto del estímulo por fructosa y glucosa en el desarrollo durante 21 días de exposición. FA: fructosa en autoclave, FF: fructosa en filtración, GA: glucosa en autoclave, GF: glucosa en filtración, T: testigo

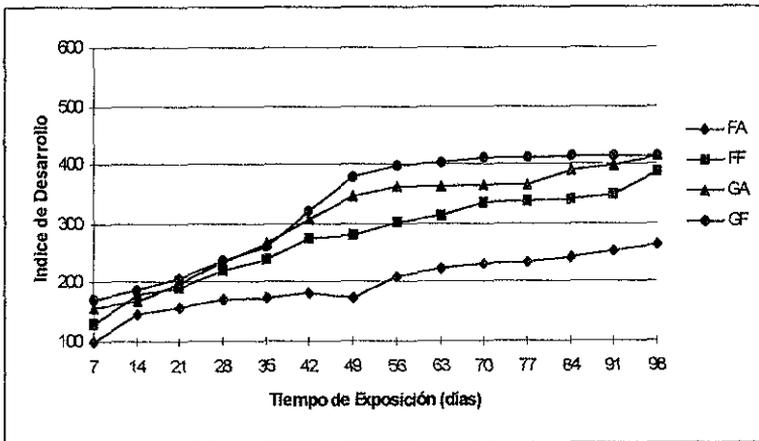


Gráfica 9. Efecto del estímulo por fructosa y glucosa en el desarrollo durante 30 días de exposición.



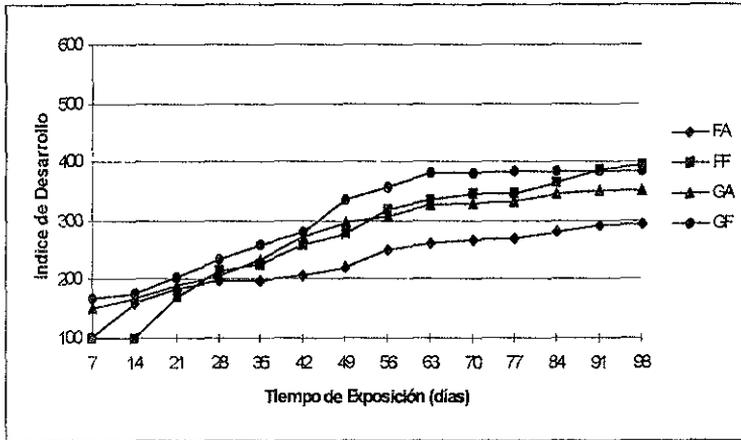
Gráfica 10. Efecto del estímulo por fructosa y glucosa en el desarrollo durante 45 días de exposición.

Cuando las semillas se mantuvieron con el estímulo de los carbohidratos durante 38 días, la repuesta morfogénica se inició a partir de los 42 días en glucosa; en tanto que, para fructosa esterilizada por filtración se inició a partir de los 56 días alcanzándose al final del cultivo (98 días) un índice de desarrollo de 400 (plántula con una hoja) en estas semillas (Gráfica 11).

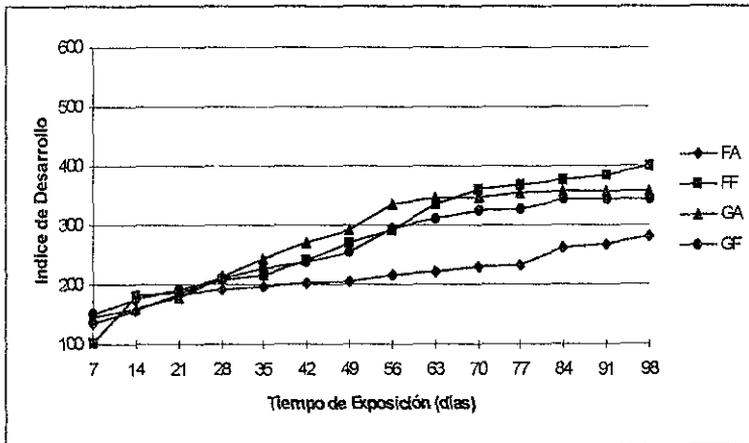


Gráfica 11. Efecto del estímulo por fructosa y glucosa en el desarrollo durante 38 días de exposición.

En aquellas semillas que se mantuvieron expuestas durante 52 y 60 días al estímulo de GA y FF, la respuesta morfogénica se inició en el momento en que se suspendió el estímulo de los carbohidratos; dicha respuesta se observó a los 56 y 63 días respectivamente en las gráficas 12 y 13. En tanto que en GF esta respuesta se inició a los 49 días en los carbohidratos esterilizados por filtración, y se alcanzó un índice de desarrollo de 400 al final del cultivo (Gráfica 12). Por otro lado, a los 60 días de exposición, este índice sólo se alcanzó en FF al final del cultivo (Gráfica 13).

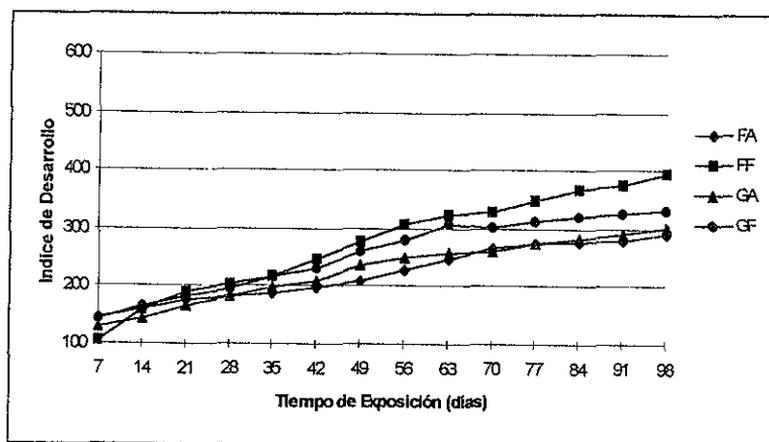


Gráfica 12. Efecto del estímulo por fructosa y glucosa en el desarrollo durante 52 días de exposición.



Gráfica 13. Efecto del estímulo por fructosa y glucosa en el desarrollo durante 60 días de exposición.

En aquellas semillas que se mantuvieron con el estímulo de los carbohidratos durante todo el cultivo esta respuesta morfológica sólo se da en los carbohidratos esterilizados por filtración, se inició a los 63 días y únicamente alcanzaron el índice de 400 las semillas expuestas a fructosa (Gráfica 14).



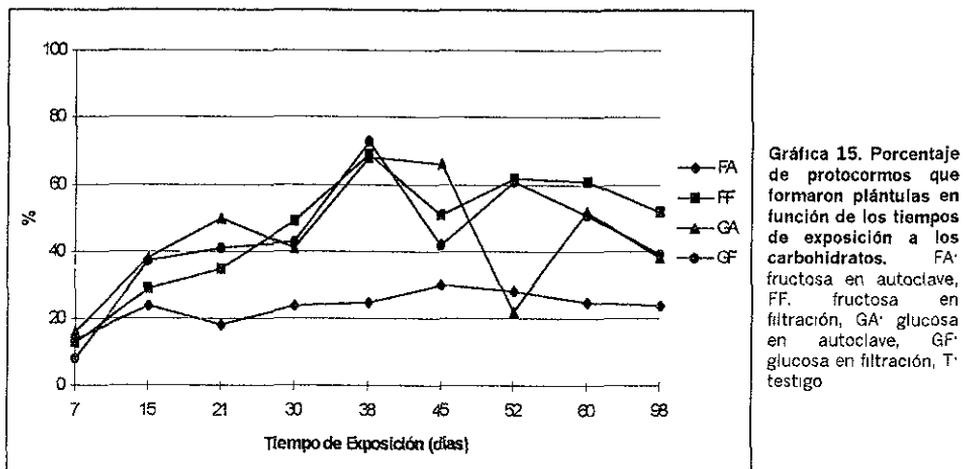
Gráfica 14. Efecto del estímulo por fructosa y glucosa en el desarrollo durante 98 días de exposición.

TIEMPO MÍNIMO REQUERIDO PARA INDUCIR LA RESPUESTA MORFOGÉNICA EN EMBRIONES DE *Laelia speciosa*.

Aún cuando al término del cultivo el máximo índice de desarrollo que se obtuvo fue de 400 (plántula con una hoja), se constató que algunas de éstas plántulas de *L. speciosa* presentaban en este momento más de dos hojas (estadio 5) y al menos una raíz (estadio 6).

Las semillas de orquídea requieren de una fuente externa de glúcidos para pasar del estadio de protocormo al estadio de plántula (Leroux *et al.*, 1995). Sin embargo, no es esencial mantener las semillas y los protocormos bajo el estímulo indefinido (Harrison & Arditti, 1978), para inducir la respuesta morfológica. En *L. speciosa* se pudo observar que en todos los tiempos de exposición al estímulo de los carbohidratos esta respuesta se dió en mayor o menor grado. De las semillas y protocormos que se mantuvieron bajo el estímulo de FF y glucosa (GA y GF) durante 38 días; entre el 68 y 73 % de éstos se desarrollaron a plántulas (Gráfica 15). Considerándose este tiempo de exposición como el tiempo mínimo requerido para inducir este tipo de respuesta por ser el primer tiempo de exposición donde se rebasa más del 50% de plántulas desarrolladas. Esta respuesta quizá se debe a que ambos carbohidratos son monosacáridos de seis carbonos (hexosas) y presentan características químicas similares.

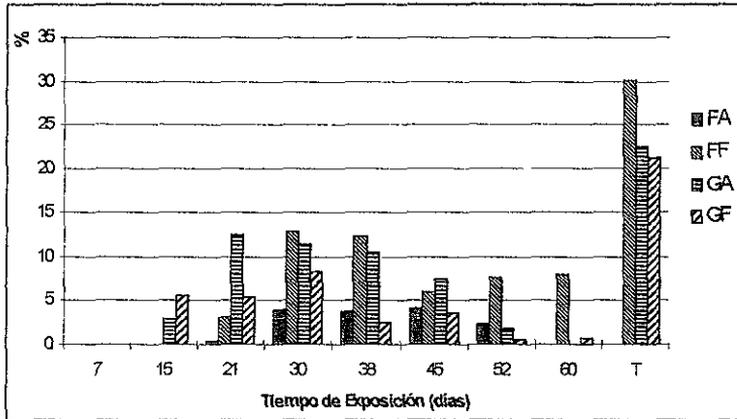
Estos resultados concuerdan con los obtenidos para el género *Cattleya*, cuyos embriones requieren de un estímulo aproximadamente durante 40 días (Arditti, 1990).



PLÁNTULAS CON AL MENOS UNA RAÍZ VERDADERA (ESTADIO 6)

En la gráfica 16 se puede observar que las semillas de *L. speciosa* que estuvieron expuestas durante 7 días al estímulo de fructosa (FA y FF) y glucosa (GA y FF), no lograron completar el proceso de germinación, es decir no desarrollaron raíz. De la misma forma, este proceso no culminó en las semillas que se mantuvieron expuestas a fructosa durante 15 días.

Harrison y Arditti (1978), reportan que cuando las semillas de *Cattleya aurantiaca* son germinadas sobre fructosa y glucosa esterilizada en autoclave, el porcentaje de plántulas desarrolladas sobre fructosa es más bajo que en glucosa. Una respuesta similar ocurrió en las semillas de *L. speciosa* ya que aquellas que permanecieron sobre fructosa esterilizada en autoclave no culminaron el proceso de germinación. Sin embargo, se observó que el efecto del estímulo limitado de los carbohidratos utilizados, induce en menor proporción la culminación del proceso, en comparación con aquellas que se mantuvieron durante todo el cultivo bajo el estímulo de los carbohidratos; obteniéndose un 29% en FF, 23% en GA y 21% en GF. Esta respuesta probablemente se debe a que la concentración de los nutrientes disminuye a través del tiempo, lo cual induce la formación de raíces.



Gráfica 16. Plántulas con raíz verdadera (estadio 6) obtenidas al final del cultivo. FA: fructosa en autoclave, FF: fructosa en filtración, GA: glucosa en autoclave, GF: glucosa en filtración, T: testigo

CONCLUSIONES

Las semillas de *Laelia speciosa* presentaron un porcentaje de embriones viables del 88%.

Fructosa y glucosa son una buena fuente de carbohidrato para inducir la germinación y desarrollo de los embriones de *Laelia speciosa*.

El primer signo de germinación se dió a los 7 días de cultivo en ambos carbohidratos.

El porcentaje de germinación de las semillas de *L. speciosa*, expuestas tanto en fructosa como glucosa, fue aproximadamente del 89%.

La germinación no se ve afectada por el carbohidrato, tipo de esterilización y tiempo de exposición.

La glucosa esterilizada por ambos métodos induce una respuesta morfogénica de los embriones.

La fructosa induce una respuesta morfogénica sólo cuando se esteriliza por filtración.

El máximo índice de desarrollo que se obtuvo al final del cultivo fue de 400 (estadio de plántula con una hoja) en FF, GA y GF.

La respuesta morfogénica de las semillas expuestas durante 38 días al estímulo de FF, GA y GF se inicia a los 42 días de cultivo.

Treinta y ocho días de exposición de las semillas sobre glucosa y fructosa esterilizada por filtración, es el tiempo mínimo requerido por los embriones para inducir un máximo desarrollo de plántulas.

La culminación del proceso de germinación es menor cuando el estímulo es limitado.

El máximo porcentaje de plántulas en estadio seis se obtuvo cuando se mantiene constante el estímulo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham & Vatsala, 1981. Introduction to Orchids. Tropical Botanic Garden & Research. Institute Trivandrum 6950011, India: 32, 55, 56, 134 pp.
- Anderson, A. B. 1991. Symbiotic and asymbiotic germination and growth of *Spiranthes magnicamporum* (Orchidaceae). *Lindleyana*, 6(4): 6-15.
- Arditti, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. *The Botanical Review*. 33(1): 1-83.
- _____. 1982. Orchid Biology. Reviews and Perspectives I. Comstock Publishing Associates. U.S.A: 173 pp.
- _____. 1992. Classification and Naming of Orchids. in: Fundamentals of Orchids Biology. John Wiley & Sons. U.S.A. 248, 548 pp.
- _____, M.A. Clements; G. Fast; G. Hadley; G. Nishimura & R. Ernst. 1982. Orchid seed germination and seedling culture. A manual. in: Orchid biology. Reviews and perspectives II. J. Arditti (Ed.). Cornell Univ. Press. U.S.A.: 243-370p.
- _____ & R. Ernst. 1984. Physiology of germinating orchid seeds. In Orchid Biology III. J. Arditti (Ed.). Comstock Publishing Associates. U.S.A.: 177-222 pp.
- _____, R. Ernst; Tim W. Y. & Charles G. 1990. The contributions of orchid mycorrhizal fungi to seed germination: A speculative review. *Lindleyana*., 5(4): 249-255.
- Baker, K.M, M.C. Mathes & B.J. Wallace. 1987. Germination of *Phontheiva* and *Cattleya* seeds and development of *Phalaenopsis* protocorms. *Lindleyana*, 2(2): 77-83.
- Bechtel Helmut, Phillip Cribb & Edmund Launert. 1986. The manual of cultivated orchid species. The MIT Press. Cambridge, Massachusetts.
- Buentello, V. B., H. Rosas y S. Luna, 1997. Efecto de la exposición limitada de fructosa y sacarosa al inicio de la germinación de semillas de *Laelia speciosa*. Memorias del VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y II Simposio Internacional sobre Ingeniería de Bioprocesos. Celebrado en Mazatlán, Sin. del 8 al 12 de septiembre.
- Clements, Mark A. 1988. Orchid Mycorrhizal Associations. *Lindleyana*, 3(2): 73-86.
- Cronquist, A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press. New York. 1262 pp.
- Currah, R. S., E. A. Smmreciu & S. Hambleton. 1990. "Mycorrhizae and Mycorrhizal Fungi of Boreal Species of *Platanthera* and *Coeloglossum* (Orchidaceae)". *Canadian Journal Botany*. 68: 1171-1181.

- De Pauw, M. A. & W. R. Remphrey. 1992. In vitro germination of three *Cypripedium acaule* species in relation to time of seed collection, media and cold treatment. *Canadian Journal Botany*, 71: 879-885.
- De Lapiner, J.M. 1973. Orquídeas Michoacanas. Comisión forestal del Estado de Michoacán (CFEM). Serie técnica. No. 4. 2^{da}. edición. Época. México.
- Del Castillo, M & D. J. Ackerman. 1992. The Orchids of Puerto Rico and the Virgin Islands. Editorial de la Universidad de Puerto Rico. Puerto Rico.
- Dressler, R. L. 1981. The Orchids: Natural history and classification. Harvard University Press. Cambridge, U.S.A.
- _____. 1993. Phylogeny and Classification of the Orchid Family. Dioscorides Press. Portland Oregon. 314 pp.
- Ernst, R.J. 1967. Effects of carbohydrate selection on the growth rate of freshly germinated *Phalaenopsis*. *American Orchid Society Bulletin*, 36: 1068-1073.
- _____, J. Arditti & P. L. Healey. 1971. Carbohydrate Physiology of Orchid seedlings II. Hidrolysis and effects of oligosaccharides. *American Journal of Botany*, 58(9): 827-835.
- _____, and E. Rodríguez. 1984. Carbohydrates of Orchidaceae in Orchid Biology, III. J. Arditti. (Ed.). Comstock Publishing Associates. U.S.A.: 223-260 pp.
- _____, & J. Arditti. 1990. Carbohydrate physiology of orchid seedlings. III. Hydrolysis maltoolosaccharides by *Phalaenopsis* (Orchidaceae) seedlings. *American Journal of Botany*, 77(2): 188-195.
- Hadley, G. 1982. Orchid Mycorrhiza. in: Orchid Biology. Reviews and perspectives II. J. Arditti. (Ed.). Comstock publishing Associates. U.S.A.: 83-118 pp.
- Halbinger, F. 1993. Laelias de México. Asociación Mexicana de Orquideología, A.C. México. pp: 62-68 p.
- Han, K. & 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 Tissue and Organ Culture*, 31: 211-214.
- Harrison, C. R. 1977. Ultrastructural and Histochemical changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). *Botanical Gazette*, 138(1): 41-45.
- _____, and J. Arditti. 1978. Physiological changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). *Botanical Gazette*, 139(2): 180-189.
- Hérrnandez, A.M. 1992. Dinámica poblacional de *Laelia speciosa*. Tesis de Licenciatura. UNAM. México.

- Hollingsworth P. M. & J. H. Dickson. 1997. "Genetic Variation in Rural and Urban Populations of *Epipactis helleborina* (L.) Crontz. (Orchidaceae) in Britain". *Botanical Journal of the Linnean Society*, 123: 321-331.
- Hoshi, Y., Katsuhiko Kondo & Shuuichi Hamatani. 1994. In vitro seed germination of four asiatic taxa of *Cypripedium* and notes on the nodal micropropagation of american *Cypripedium montanum*. *Lindleyana*, 9(2): 93-97.
- Juárez, S.R. 1994. Respuesta organogénica in vitro de orquídea (*Laelia autumnalis* (Lindl)) y violeta africana (*Saintpaulia ionantha* (Wendl.)) al adición de vitaminas al medio de cultivo. Tesis de Licenciatura. UNAM. México.
- Kubota Chieri & Toyoki Kozai. 1991. Effects of initial amount of sugar in the medium on the growth of *Cymbidium* PLB in vitro. *Hortscience*, 26(6).
- Leroux, G., Barabé, D. & Vieth, J. 1995. Morphogenèse comparée de protocormes du *Cypripedium acaule* (Orchidaceae) cultivés in vitro avec ou sans sucre. *Canadian Journal Botany*, 73: 1391-1406.
- Lesica, P. & K. R. Antibus. 1990. The occurrence of mycorrhizae in vascular epiphytes of two Costa Rican rain forests. *Biotropica*, 22(3): 250-258.
- Luna, R.B. & 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 Bioingeniería. Monterrey, N.L. Méx.
- _____ & A. A. Barba. 1993. Estudio morfogénico de la semilla de *Laelia speciosa* (H. B. K.) SCHLTR. durante su germinación asimbiótica in vitro. V Encuentro Latinoamericano de Orquideología. Octubre, 19-25; 24-25 p.
- Martínez, P.A. 1991. Propagación masiva in vitro y recuperación de poblaciones de orquídeas en peligro de extinción. Tesis de Maestría, UNAM. México.
- Masuhara G. & K. Katsuya. 1989. Effects of mycorrhizal fungi seed germination and early growth of three japanese terrestrial orchids. *Scientia Horticulturae*, 37: 331-337.
- Miyoshi, K; M. Mii. 1995. "Phytohormone pre-treatment for the enhancement of seed germination and protocorm formation by terrestrial orchid, *Calanthe discolor* (Orchidaceae) in symbiotic culture". *Scientia Horticulturae*, 63: 263-267.
- Mittelstaedt, O. 1993. Las Orquídeas. Guía Práctica para su Cultivo. 2a. edición. Asociación Altaverapacense de Orquideología. Cobán, Guatemala.
- Moreno, M. E. 1984. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Instituto de biología. UNAM. México.

- Neyra, M.C., S. Sánchez y S. Luna, 1997. Efecto de glucosa y manitol sobre la germinación *in vitro* de semillas de *Laelia speciosa*. Memorias del VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y II Simposio Internacional sobre Ingeniería de Bioprocesos. Celebrado en Mazatlán, Sin. del 8 al 12 de septiembre.
- Nishimura, G. 1981. Comparative morphology of *Cattleya* and *Phalaenopsis* (Orchidaceae) seedlings. *Botanical Gazette*, 142(3): 360-365.
- Peña G. Ma. Del Rosario & Peña Magdalena, 1981. Uso de las orquídeas en México desde la época prehispánica hasta nuestros días. *Orquídea*, 8(1): 1-48.
- Peterson, R.L. & Currah, R.S. 1990. Synthesis of mycorrhizae between protocorms of *Goodyera repens* (Orchidaceae) and *Ceratobasidium cereale*. *Canadian Journal Botanical*, 68: 1117-1125.
- Philip, V.J. & S.A.Z. Nainar. 1988. Structural changes during the *in vitro* germination of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 61: 139-145.
- Pierik, R. L. M. 1990. Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Mundi-Prensa. España. pp: 149-151
- Rao, A.N. 1977. Tissue culture in orchid industry. pp 44-69. en Applied and fundamentals aspects of plant cell, tissue and organ culture. J. Reinert y y. P. S. Bajaj (Eds). Springer Verlag, Berlin.
- Richardson, K. A., R. L. Peterson and Currah. 1992. Seed reserves and early symbiotic protocorm development of *Platanthera hyperborea* (Orchidaceae). *Canadian Journal Botany*, 70: 291-300.
- Rubluo, A., Victor Chávez & Alejandro Mtz. 1989. *in vitro* seed germination and re-introduction of *Bletia urbana* (Orchidaceae) in its natural habitat. *Lindleyana*, 4(2): 68-73.
- Shoushtari Banafsheh D; Ramin Heydan, Gregory L. Johnson & Joseph Arditti. 1994. Germination and Viability Staining of Orchid Seeds Following Prolonged Storage. *Lindleyana*, 9(2): 77-84.
- Smreciu E. A. & R. S. Currah. 1989. Symbiotic germination of seeds of terrestrial orchids of North America and Europe. *Lindleyana*, 4(1): 6-15.
- Soto, M. A. 1988. Listado actualizado de las orquídeas de México. *Orquídea*, 11: 233-277.
- _____. 1990. *Laelia speciosa* (H.B.K.) Kund. in *icones orchidacearum, orchids of Mexico*. E. Hagsater y Salazar G. (Eds). Asociación Mexicana de Orquideología, A.C.

- _____, & E. Hágsater. 1990. Algunas ideas acerca de la conservación de las orquídeas mexicanas y un listado terminal de los taxos amenazados. pp. 155-172. en Áreas naturales protegidas en México y especies en extinción J.L. Camarillo y Rivera, F. (Eds) UNAM.
- Stancato, G. C. & R. T. Faria. 1996. In vitro growth and mineral nutrition of the lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* Batem. (Orchidaceae) I: Effects of macro and microelements. *Lindleyana*, 1(1): 43-44.
- St-Arnaud Mare, Denis Lauzer & Denis Barabé. 1992. In vitro germination and early growth of seedlings of *Cyripedium acaule* (Orchidaceae). *Lindleyana*, 7(1): 22-27.
- Thompson, A. P. 1980. Orchids from seed. Royal Botanic Gardens. England.
- Thornhill A. & Harold Koopowitz. 1992. Viability of *Disa uniflora* Berg. (Orchidaceae) seeds variable storage conditions: Is orchid gene-banking possible?. *Biological Conservation*, 62: 21-27.
- Tsutsui K. & M. Tomita. 1990. Suitability of several carbohydrates as the carbon sources for symbiotic seedling growth of two orchid species. *Lindleyana*, 5(2): 134-139.
- Velazquez, V. R. 1997. Efecto de sacarosa, glucosa y fructosa sobre la germinación de las semillas, el desarrollo y crecimiento de plántulas de *Laelia speciosa* (H. B. K.) Schltr. Cultivadas in vitro. Tesis Profesional. UNAM. FES-ZARAGOZA. México. 62 pp.
- Wiard, L. A. 1987. An Introduction to the Orchids of México. Comstock Publishing Associates a Division of Cornell University Press.: 83 p.
- Withner, C. L. 1988. The Orchids: A Scientific Survey. Robert E. Krieger Publishing Company. U.S.A.
- Zettler L. W., & Thomas M. McInnis, Jr. 1993. Symbiotic Seed Germination And Development of *Spiranthes cernua* and *Goodyera pubescens* (Orchidaceae: Spiranthoideae). *Lindleyana*, 8(3): 155-162.
- _____, Felicity V. B. & Thomas M. McInnis, Jr. 1995. Development morphology of *Spiranthes odorata* seedlings in symbiotic culture. *Lindleyana*, 10(3): 211-216.

ANEXO

NUTRIENTES	CANTIDAD
MACRONUTRIENTES	
NH_4NO_3	1650 mg/l
MgSO_4	1807 mg/l
KH_2PO_4	170 mg/l
KNO_3	1900 mg/l
CaCl_2	3322 mg/l
MICRONUTRIENTES	
ZnSO_4	86 mg/l
CoCl_2	0.025 mg/l
H_3BO_3	6.02 mg/l
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16.9 mg/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.025 mg/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.25 mg/l
KI	0.83 mg/l
EDTA $\text{Na}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	37.26 mg/l
FeSO_4	2708 mg/l
INOSITOL	
Mito-inositol	100 mg/l
VITAMINAS	
Tiamina HCl	0.4 mg/l
Niacina	0.5 mg/l
Piridoxina HCl	0.1 mg/l
FUENTE DE CARBONO Y ENERGÍA	
Carbohidrato*	30 g/l
AGENTE SOLIDIFICANTE	
Agar-ger (Sigma)	5 g/l

TABLA 1. Composición del medio de cultivo Murashige-Skoog. * Se suplemento al medio como fructosa y glucosa.

PORCENTAJE DE GERMINACION PR > F

DIAS DE OBSERVACION

VARIABLE	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	98
CARBOH*CARBOH	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0003	*0.0002	*0.0007	*0.0027	*0.0027	*0.0074	0.1612	0.0586	0.2642	0.6585	0.4210
TPOEXP	0.2707	*0.0234	0.2501	0.1257	0.1616	0.1635	0.0668	*0.0435	*0.0460	*0.0446	0.0610	0.2853	*0.0008	*0.0012
ESTERI	*0.0002	0.1298	*0.0077	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001	0.0583	*0.0001	*0.0001
CARBOH*TPOEX	*0.0001	*0.0006	*0.0015	*0.0007	*0.0109	*0.0126	*0.0061	*0.0005	*0.0003	*0.0001	*0.0001	0.5404	*0.0001	*0.0001
CARBO*ESTERI	0.0721	0.4325	0.2628	0.7973	0.9875	0.3527	*0.0650	*0.0270	*0.0158	*0.0432	*0.0433	0.5719	*0.0038	*0.0173
TPOEXP*ESTERI	*0.0003	*0.0021	*0.0307	0.1038	0.1438	0.1096	0.0727	0.0615	0.0605	0.1882	0.1562	0.6163	0.1776	0.2792
CARBOH*TPOEXP*ESTERI	*0.0024	*0.0059	0.2356	0.0699	*0.0422	0.2690	0.4400	0.1938	0.2132	0.4339	0.2384	0.4697	0.1536	0.0983

Tabla 7. Probabilidad de obtener un valor $F >$ al observado en la germinación de *Laelia speciosa*, en relación a los factores: tipo de carbohidrato, tipo de esterilización y tiempo de exposición. CARBOH =Carbohidrato (Fructosa y glucosa), TPOEXP =tiempo de exposición, ESTERI= tipo de esterilización (filtración y autoclave). CARBOH*TPOEXP =interacción entre el carbohidrato y tiempo de exposición, CARBO*ESTERI =interacción entre el carbohidrato y el tipo de esterilización, TPOEXP*ESTERI =interacción entre el tiempo de exposición y el tipo de esterilización, CARBOH*TPOEXP*ESTERI = interacciones entre el carbohidrato, tiempo de exposición y tipo de esterilización, * Rangíones significativos ($p \leq 0.05$)

INDICE DE DESARROLLO PR>F

DIAS DE OBSERVACION

VARIABLE	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	98
CARBONH	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001
TPOEXP	0.3173	0.0338	0.4574	*0.0177	*0.0004	*0.0004	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001
ESTERI	*0.0003	0.0634	0.1265	*0.0020	*0.0003	*0.0004	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001
CARBONH*TPOEXP	*0.0001	*0.0003	*0.0168	*0.0093	0.1587	*0.0011	*0.0001	*0.0005	*0.0009	*0.0007	*0.0005	*0.0003	*0.0009	*0.0081
CARBONH*ESTERI	0.0859	0.6735	0.2969	*0.0092	*0.0007	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001	*0.0001
TPOEXP*ESTERI	*0.0003	*0.0018	0.1022	0.5570	0.1440	0.1651	0.1159	0.2193	0.2796	0.2220	0.1669	0.2999	0.3120	0.3129
CARBONH*TPOEXP*ESTERI	*0.0024	*0.0094	0.4021	0.3634	*0.0417	*0.0148	*0.0281	*0.0148	*0.0471	0.0529	0.0684	0.1047	0.4142	0.5738

Tabla 8. Probabilidad de obtener un valor $F >$ al observado en el desarrollo de *Laelia speciosa*, en relación a los factores: tipo de carbohidrato, tipo de esterilización y tiempo de exposición. CARBOH =Carbohidrato (Fructosa y glucosa), TPOEXP =Tiempo de exposición, ESTERI= Tipo de esterilización (Filtración y autoclave), CARBOH*TPOEXP =interacción entre el carbohidrato y tiempo de exposición, CARBO*ESTERI =interacción entre el carbohidrato y el tipo de esterilización, TPOEXP*ESTERI =interacción entre el tiempo de exposición y el tipo de esterilización, CARBOH*TPOEXP*ESTERI = Interacciones entre el carbohidrato, tiempo de exposición y tipo de esterilización, * Renglones significativos ($p \leq 0,05$)