

00345



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Germinación y desarrollo in vitro de Paphiopedilum exstaminodium (Castaño, Hagsater & Aguirre) V. A. Albert & Borge Pett. y P. caudatum (Rolfe) V. A. Albert & Borge Pett. (Orchidaceae), especies en peligro de extinción.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA VEGETAL)

P R E S E N T A:

LUISA MARGARITA RODRIGUEZ FLORES

DIRECTOR DE TESIS: DR. ABRAHAM RUBLUO ISLAS



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 INVESTIGACION SE REALIZO EN EL  
LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES DEL JARDIN BOTANICO  
DEL INSTITUTO DE BIOLOGIA, U. N. A. M. , BAJO LA DIRECCION DEL DR.  
ABRAHAM RUBLUO ISLAS

CON EL APOYO DEL COMITE DE BECAS-CREDITO DEL CONSEJO NACIONAL  
DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACyT)

## AGRADEZCO

Al Dr. Abraham Rubluo Islas por la dirección y asesoramiento del presente trabajo de investigación.

A cada uno de los sinodales por su disposición inmediata para enriquecer y mejorar el trabajo escrito:

Dr. Abraham Rubluo Islas  
M. en C. Ernesto Aguirre León  
Dr. Víctor Manuel Chávez Avila  
M en C. Magdalena Peña Muñoz  
Dra. María Victoria Sosa Ortega  
Dra. Clara Esquivel Huesca  
M en C. Salvador Arias Montes

Al Jardín Botánico, Instituto de Biología (UNAM) y al Dr. Robert Bye Boettler por permitirme el uso de sus instalaciones para la realización del presente trabajo.

A la Asociación Mexicana de Orquideología (AMO) por proporcionar el material biológico utilizado en la presente investigación.

Al Biól. Agustín Vargas por el asesoramiento estadístico.

Al M. en C. Ernesto Aguirre por su estímulo y guía constantes.

A Gerardo Salazar por compartir conmigo su amplia experiencia y amistad.

A Miguel Angel Soto por su ayuda y orientación.

A la M en C. Magdalena Peña por su apoyo y enseñanzas.

Al Dr. Víctor Manuel Chávez por su amistad y orientación certera.

A la Biól. Ana Laura López Escamilla por su invaluable ayuda en la toma de fotografías y por sus acertadas sugerencias del escrito.

A la Dra. Alicia Brechu por su disposición y acertadas sugerencias al trabajo escrito.

Al Dr. Alejandro Martínez Palacios por su amistad e incondicional orientación.

A mis compañeros del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales: Ana Laura, Paty, Liz, Alejandro, Marco, Martín, Mabel, Liza, Tere, Bárbara e Ingrid por su ayuda y amistad desinteresados.

A cada una de las personas de otros departamentos y laboratorios del Jardín Botánico por su apoyo y compañerismo.

## DEDICO ESTA TESIS

A Roberto, compañero y amigo siempre, gracias por tu apoyo, amor y guía. Con todo mi amor.

A mi hijo Luis Roberto, que desde que llegó iluminó mi camino y mi vida. Con cariño infinito

A mis padres, que con su ejemplo y amor incondicional han sido pilar y guía. Los quiero mucho.

A mis hermanos, que a pesar de la distancia seguimos juntos. Con inmenso cariño.

A mi abuelita, tíos y primos por su cariño y apoyo desinteresados.

Y a tí abuelito, donde estés, te recuerdo siempre ..

## INDICE

	Pag.
RESUMEN	4
I. INTRODUCCION	5
I 1. ANTECEDENTES	10
I. 1. a. Las especies: ubicación taxonómica	10
I. 1. b. <i>Paphiopedilum exstaminodium</i> (Castaño, Hágsater & E. Aguirre) V. A. Albert & Borge Pett.	11
I. 1. c. <i>Paphiopedilum caudatum</i> (Rolfe) V. A. Albert & Borge Pett.	12
I. 1. d. Las semillas de las orquídeas.	12
I 1. e. Germinación asimbiótica.	14
I 1. f. Cultivo <i>in vitro</i> de semillas maduras (fruto dehiscente) y cultivo <i>in vitro</i> de semillas inmaduras (fruto no dehiscente)	17
I. 1. g. Reproducción a través de semillas	19
I. 1. h. Técnicas de micropropagación en orquídeas.	19
I 1 i. Propagación <i>in vitro</i> de protocormos.	22
I. 1. j. Los complejos orgánicos y el carbón activado en el cultivo <i>in vitro</i> de orquídeas.	23
I. 2. JUSTIFICACION	25
I. 3. OBJETIVOS	26
II. MATERIALES Y METODOS	27
II. 1. Germinación asimbiótica.	27
II. 1. a. Material biológico.	27
II. 1. b. Almacenamiento de semillas.	27
II. 1. c. Medios de cultivo.	27
II 1. d. Complejos orgánicos	28
II. 1. e. Desinfección de semillas.	29
II 1 d. Siembra.	29
II 1. e. Condiciones de cultivo.	30

II. 1 f. Cuantificación de la germinación.	30
II. 2 Desarrollo de plántulas de <i>Paphiopedilum caudatum</i> .	32
II. 3. Secciones de protocormos.	32
II. 4. Aclimatación de plántulas a condiciones de invernadero	33
II. 5. Análisis estadístico.	34
III RESULTADOS	35
III 1. Germinación asimbiótica en <i>Paphiopedilum exstaminodium</i> y <i>P. caudatum</i> .	35
III. 2. Desarrollo de plántulas de <i>P. caudatum</i> .	43
III. 3. Secciones de protocormos.	45
III. 4. Establecimiento de las plántulas en invernadero.	45
IV. DISCUSION	46
IV. 1. El uso de complejos orgánicos y carbón activado en la germinación y el crecimiento de las plántulas.	46
IV. 2. Respuesta por tipo de fruto.	47
IV. 3. Efectos del pH en el desarrollo de las plántulas.	48
IV. 4. Secciones de protocormos.	49
IV. 5. Establecimiento en invernadero.	51
V. CONCLUSIONES	52
VI REFERENCIAS	54
APENDICE 1. Medio de cultivo KCm.	62
APENDICE 2. Medio de cultivo RE.	62
APENDICE 3. Medio de cultivo MS.	63
ANEXO 1. Descripción botánica de <i>P. exstaminodium</i> .	64
ANEXO 2. Descripción botánica de <i>P. caudatum</i> .	65

## RESUMEN

Semillas inmaduras y maduras de dos especies de orquídeas del género *Paphiopedilum* se sembraron asimbióticamente en los medios de cultivo Knudson C y RE modificados y adicionados con compuestos orgánicos y carbón activado. La germinación se evaluó al determinar el porcentaje y el índice de germinación a las 12 semanas de cultivo en condiciones de oscuridad a  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ . La presencia de aditivos como el plátano y el agua de coco así como el carbón activado mejoraron significativamente la respuesta de germinación y el desarrollo de las plántulas. Las semillas maduras, provenientes de frutos dehiscentes, respondieron mejor ante la mayoría de los tratamientos aunque se obtuvo una excelente respuesta con las semillas inmaduras de frutos verdes ante el medio de cultivo Knudson C adicionado con pulpa de plátano y carbón activado.

Se intentó la micropropagación mediante protocormos seccionados pero los resultados fueron negativos, por lo que se propone utilizar protocormos sin seccionar, otro tipo de explante y/o medios de cultivo.

## I. INTRODUCCION

Las orquídeas (Orchidaceae) a pesar de conformar una de las más grandes y diversas familias de plantas con flores, con cerca de 800 géneros y de 20,000 a 30,000 especies, probablemente se encuentran también entre las más seriamente amenazadas de extinción (Bechtel *et al.*, 1992). Un factor decisivo que ha contribuido a la devastación de poblaciones enteras de orquídeas al grado de causar la desaparición de algunas especies de su medio natural es la destrucción de su hábitat. Un solo árbol tropical puede sostener cientos de especies de orquídeas epífitas y muchas especies de plantas y animales. El alcance de la deforestación es tan grande que llegan a perderse anualmente millones de hectáreas de bosques por la expansión de las actividades humanas como la ganadería y la agricultura, entre otras. Aún cuando se dejen fragmentos del hábitat original, el flujo genético y el número de polinizadores se ven significativamente reducidos (Pridgeon, 1996). Por otra parte, las flores de muchas especies poseen un amplio rango de formas, colores, aromas y un alto valor estético que las han colocado en una posición privilegiada en el mercado mundial de plantas de ornato (Ospina, 1996). Sin embargo durante la segunda mitad del siglo XX, la sobrecolecta y el comercio con ejemplares silvestres ha aumentado a tal punto que muchas especies han sido depredadas y llevadas casi a la extinción (von Arx, 1996).

En la década de los 60's muchas organizaciones, incluyendo la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (UICN), tomaron la iniciativa de crear una convención internacional que pudiera asegurar la conservación de especies silvestres sujetas a un comercio internacional. La Convención sobre Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES) fue fundada en 1975 con la firma de 21 países en Washington D.C. (Knees, 1989) y para agosto de 1999, 145 países incluyendo México eran ya miembros de dicha convención. Una característica fundamental de CITES es el de enfatizar en la conservación de aquellas especies amenazadas que se comercializan internacionalmente, más que ser un listado de las especies del mundo en peligro de extinción o amenazadas. Dentro de sus funciones CITES no prohíbe, sino regula el comercio internacional de especies de plantas y animales silvestres que están o que pueden llegar a estar amenazadas o

en peligro de extinción, de manera que se pueda prevenir cualquier extinción debida a la explotación no sustentable de estas especies. La regulación de dicho comercio requiere de la cooperación tanto de los países de donde procede la especie en cuestión como de los consumidores (Knees, 1989, Rodan y Campbell, 1996; von Arx, 1996).

Las especies silvestres cuyo comercio está regulado por la Convención, se enlistan en tres Apéndices diseñados para ofrecer diferentes grados de protección (Stewart, 1988). En el Apéndice I se incluyen especies amenazadas inminentemente por su comercio, el cual está prohibido excepto en circunstancias especiales, como es el caso de los ejemplares propagados artificialmente cuando cuenten con un permiso de exportación expedido por el país de origen y otro de importación del país destinatario. El Apéndice II incluye especies que están en menos peligro, pero que pueden llegar a considerarse amenazadas de extinción si su comercio no se regula y por lo cual requieren de un permiso de exportación para su comercio. El Apéndice III señala las especies que pueden estar amenazadas debido a un intenso comercio y que no se incluyen en los Apéndices I o II, para que puedan tener un control legal de exportación con la ayuda de otros países miembros de la Convención (Knees, 1989).

Debido a que las orquídeas se comercializan sin flores, y a la dificultad de distinguir en este estado a las especies amenazadas de las que no lo están, toda la familia Orchidaceae está incluida en los Apéndices I y II del CITES. Las especies incluidas en el Apéndice I son: *Cattleya trianaei*, *Dendrobium cruentum*, *Laelia jongheana*, *L. lobata*, *Peristeria elata*, *Renanthera imschootiana*, *Vanda coerulea* y desde enero de 1990 todas las especies de los géneros *Paphiopedilum* y *Phragmipedium* (Kehew, 1991). Muchas de las especies de estos géneros se han sobrecolectado, devastándose poblaciones aún dentro de áreas protegidas tales como parques nacionales y reservas naturales. En la naturaleza, la mayoría de estas especies son raras debido a que poseen distribuciones geográficas restringidas y hábitats específicos. Esta crítica situación es la que llevó a la inclusión de todas las especies de los géneros *Paphiopedilum* y *Phragmipedium* en el Apéndice I del CITES (Salazar, 1996). El resto de las especies de la familia Orchidaceae (20,000 aproximadamente) están incluidas en el Apéndice II, por lo que su comercio internacional se monitorea (Knees, 1989).

Por lo anterior es importante establecer estrategias que permitan la conservación de orquídeas. a) a largo plazo, como es la conservación *in situ* mediante el establecimiento

adecuado de reservas de la biósfera y b) a corto plazo utilizando métodos de conservación *ex situ*, con el fin de preservar especies fuera de sus hábitats (Christenson y Henkel, 1995). Los métodos de conservación *ex situ* consisten en el mantenimiento de las especies en cultivo e incluyen entre otras, el almacenamiento de polen y semillas y la propagación artificial reproductiva y vegetativa la cual puede ser una alternativa apropiada y benéfica en lugar de la extracción (Pritchard y Seaton, 1993; Dumont, *et al.*, 1996). Dicha propagación puede incluir cualquiera de los siguientes pasos: 1) la extracción de unas pocas plántulas o sus propágulos del medio silvestre, de manera que no se afecte la sobrevivencia futura de la población, 2) la remoción de plantas de un hábitat destruido y que no tenga perspectivas de regeneración, 3) la propagación de plantas a partir de semilla, si ésta es posible, generalmente en condiciones asépticas, 4) el cultivo de las plantas hasta ser lo suficientemente grandes para dividir las, y 5) el intercambio de ejemplares con cultivadores calificados y con expertos para asegurar la continuidad de su propagación (Dumont *et al.*, 1996). Los métodos de conservación *ex situ* son importantes en los países donde existe una alta biodiversidad de orquídeas y deben ayudar a complementar a las actividades *in situ*, así como a regular el comercio y al establecimiento de reservas. Sin embargo, a largo plazo, una reintroducción exitosa es preferible a las medidas de conservación *ex situ*. Dicha reintroducción se deberá efectuar sólo bajo condiciones y protocolos estrictamente controlados (Dumont *et al.*, 1996), conociendo y entendiendo muchos de los aspectos sobre la ecología y genética de estas plantas.

La germinación de semillas de algunas especies se puede incrementar enormemente mediante el cultivo *in vitro* cuando, por medio de los métodos de cultivo convencionales, la germinación no ocurre o es baja debido a latencia o a requerimientos de germinación específicos (Fay, 1994). Las técnicas *in vitro* consisten generalmente, en cultivar bajo condiciones asépticas prácticamente cualquier estructura vegetal (embriones, semillas, inflorescencias, tallos, raíces, meristemos, células individuales, granos de polen, etc.) y mantenerla en condiciones nutricionales y ambientales controladas (pH, fotoperíodo, intensidad luminosa, temperatura, medio de cultivo) para dirigir así las respuestas deseadas. De esta manera se pueden obtener individuos masivamente, libres de patógenos y en un periodo más corto que el observado en los cultivos tradicionales. Así, el cultivo *in vitro*, es una técnica que se está aplicando en la propagación de especies amenazadas para aumentar rápidamente el número de individuos y de esta manera, superar problemas de fertilidad y de biología

reproductiva y proporcionar material para su reintroducción (Bramwell, 1990). La propagación de las orquídeas se ha revolucionado mediante las técnicas de cultivo *in vitro* (Fay, 1994).

Las orquídeas de la subfamilia Cypripedioideae (*Paphiopedilum*, *Phragmipedium*, *Cypripedium* y *Selenipedium*) y sus híbridos han sido muy populares entre los cultivadores de orquídeas durante mucho tiempo por la belleza de sus flores. Cuando a estas especies se les otorgó protección internacional por parte del CITES, prácticamente se eliminó la posibilidad legal de comerciar con plantas colectadas de su medio silvestre. De esta manera surgió la imperiosa necesidad de propagarlas y de mantenerlas en cultivo (Christenson y Henkel, 1995). Desafortunadamente este grupo de orquídeas ha demostrado ser más difícil de propagar que otros géneros comunmente cultivables, por lo que hay poca producción y no se cubre la demanda del mercado (Ernst, 1974, Stimart y Ascher, 1981; Pierik *et al.*, 1988; Arditti y Ernst, 1993). Esto ha ocasionado que se continúen colectando individuos de sus poblaciones naturales y como resultado, la mayoría de las especies de estos géneros se han vuelto más raras y algunas están casi extintas (Yoshikazu *et al.*, 1994).

*Paphiopedilum exstaminodium* es una orquídea endémica del estado de Chiapas y, desde que fue descrita por Castaño, Hágsater y Aguirre en 1984, se ha vuelto más rara por la destrucción de su hábitat y a una colecta comercial masiva debido al atractivo de sus flores, cuyos pétalos pueden llegar a medir más de 50 cm de largo. Según la Norma Oficial Mexicana (NOM), publicada en el Diario Oficial del 16 de mayo de 1994, se le considera una de las especies de orquídeas mexicanas en peligro de extinción. Esta problemática existe a pesar de que casi todas las localidades donde se ubica, son sitios supuestamente protegidos como el Parque Nacional de las Lagunas de Montebello y la Reserva de la Biósfera de Montes Azules, en Chiapas. Soto (1994), reportó que muchos especímenes fueron colectados de su hábitat natural vendiéndose en Estados Unidos y en la anteriormente Alemania Occidental, considerando que la única forma de mantener a las poblaciones de *P. exstaminodium* en la naturaleza, es la reintroducción de plantas propagadas artificialmente. Este mismo autor realizó uno de los pocos estudios poblacionales y de conservación realizados con esta especie, y estimó que *P. exstaminodium* tiene un rango geográfico máximo de 85 km con 5 poblaciones conocidas en México; asimismo reporta un severo grado de destrucción de su hábitat y una

baja densidad poblacional con 39 individuos (*genets*) conocidos en la naturaleza. En la población más grande de las cinco existentes en la naturaleza, las edades presentan distribuciones normales, centradas en categorías de edad media con ausencia de plantas en las categorías menores, lo que indica que no ha habido un aumento de nuevas plantas durante los últimos años. Según Soto (*op cit.*), en poblaciones más saludables se esperaría encontrar un mayor número de individuos jóvenes con una disminución hacia los de mayor edad. En esta población la mayoría de los ejemplares son adultos en fase reproductiva, los juveniles son raros, lo que sugiere que la población es vieja y quizá con tendencia a desaparecer. Soto afirma que el reclutamiento de nuevas plantas aparentemente no está relacionado con la disponibilidad de semillas, ya que la producción de éstas es alta debido a la existencia de un mecanismo de autopolinización, por lo que los tamaños poblacionales tan pequeños pudieran deberse a una nula o baja germinación o bien, a una alta mortalidad de las plántulas.

Lo anterior dificulta las estrategias de conservación en esta especie semejante a la de muchas otras en peligro de extinción. Tal es el caso de *Paphiopedilum caudatum*, especie centroamericana taxonómicamente cercana a *P. exstaminodium* y que presenta similares circunstancias de conservación y comercialización. Por la disponibilidad de material biológico y por la problemática que presenta, esta especie también se incluyó en el presente estudio.

Con base en los antecedentes mencionados, en esta investigación se realizaron estudios tendientes a lograr la germinación y cultivo *in vitro* de semillas de *P. exstaminodium* y *P. caudatum*, con miras a generar conocimiento que permita la recuperación de poblaciones y que salvaguarde a estas especies de la extinción.

## I. 1. ANTECEDENTES

### I. 1. a. Las especies: Ubicación taxonómica

De acuerdo a la evidencia de estudios cladísticos realizados en la subfamilia Cyripedioideae (Albert, 1994), las similitudes entre los géneros *Paphiopedilum sensu stricto*, *Phragmipedium* y *Mexipedium* han llegado a ser más prominentes que sus diferencias. Por lo anterior, Albert y Pettersson (1994) proponen la expansión del género *Paphiopedilum* Pfitzer para incluir todas las orquídeas con hojas conduplicadas, pertenecientes a los géneros antes mencionados. Así, para reflejar tanto las diferencias como las similitudes a niveles jerárquicos apropiados estos autores proponen la combinación de *Paphiopedilum s.s.*, *Phragmipedium* y *Mexipedium* como subgéneros de *Paphiopedilum* Pfitzer.

De esta manera, la ubicación taxonómica de las especies en estudio, anteriormente conocidas como *Phragmipedium exstaminodium* y *Phragmipedium caudatum*, es:

REINO: Vegetal

DIVISION: Embryophyta Siphonogama

SUBDIVISION II: Angiospermas A. Br. Doell.

CLASE I Monocotyledoneae DC.

ORDEN 23. Microspermae Bentham y Hooker.

FAMILIA: Orchidaceae Lindley.

SUBFAMILIA: Cyripedioideae Lindley

GENERO. *Paphiopedilum* Pfitzer, nom cons.

SUBGENERO: *Phragmipedium* (Rolfe) V. A. Albert & Borge Pett., comb. et stat. nov.

SECCION: *Phragmipedium* (Rolfe) V. A. Albert & Borge Pett., comb. et stat nov.

ESPECIE: *Paphiopedilum exstaminodium* (Castaño, Hagsater & Aguirre) V. A. Albert & Borge Pett., comb. nov.

ESPECIE: *Paphiopedilum caudatum* (Rolfe) V. A. Albert & Borge Pett. comb. nov.

**1.1. b. *Paphiopedilum exstaminodium* (Castaño, Hágsater & E Aguirre)**

V. A. Albert & Borge Pett.

Esta especie sólo se conoce en México (Chiapas) y probablemente en la porción adyacente de Guatemala (Margaret Dix, com. pers. Gerardo Salazar); su nombre común es "tanal de bigotes". El epíteto específico *exstaminodium* aduce a la ausencia del estaminodio que a manera de escudo cubre los estambres en todas las demás especies del género (Castaño *et al.*, 1984).

*Paphiopedilum exstaminodium* se asemeja a *P. caudatum*, a excepción de que la primera carece del estambre estéril denominado estaminodio que constituye una pieza constante en las especies hasta ahora conocidas. Es muy fácil observar inmediatamente los dos estambres fértiles y sus respectivas anteras a cada lado de la columna. Los polinios están situados de tal manera que el polen se pone en contacto con la superficie estigmática. Este es un carácter que invariablemente se presenta en las plantas de Chiapas y es de suponerse que representa un rasgo adquirido por selección natural con implicaciones directas en el mecanismo de polinización (Castaño *et al.*, 1984). Evolutivamente, posiblemente el estaminodio se perdió después de que estas plantas establecieron un mecanismo de autopolinización que les permitió prescindir de los insectos para acarrear el polen de una flor a otra (McCook, 1990).

Esta especie sólo se ha observado creciendo epífita asociada a árboles y ocasionalmente a bejucos a partir de 1.50 m sobre el terreno. Habita en bosques de coníferas y encinos así como en mesófilos de montaña y las interfases de éstos dentro de un gradiente altitudinal de 950 a 1600 m en lugares con una alta humedad atmosférica, niveles de luminosidad relativamente altos y con fuertes corrientes de aire. La época de floración comienza en febrero y termina en agosto. Las cápsulas maduran en un periodo de 8-10 meses. No se conoce al polinizador. Su hábitat es húmedo y sujeto a un clima ligeramente estacional pero isotérmico; la temperatura media anual es de aprox. 19°C, libre de heladas, y con 2,500-3,500 mm de lluvia distribuidos a lo largo de 10 meses (Castaño *et al.*, 1984; Soto, 1994).

**I. 1. c. *Paphopedilum caudatum* (Rolfe) V. A. Albert & Borge Pett.**

Se distribuye principalmente en Guatemala, en las montañas centroamericanas de Honduras y Panamá así como en Ecuador, Perú y posiblemente Colombia. El epíteto específico *caudatum* se basa en los pétalos extremadamente largos que presenta la flor. Esta especie puede ser litófita en escarpaduras de granito en donde sus raíces se asocian con musgos o epífita creciendo en horquetas de árboles a 18-20 m sobre el nivel del suelo. Crece en densos y húmedos bosques tropicales de montaña y en un rango altitudinal de 1,400 a 3,000 m. Tolera la luz brillante del sol; la estación de lluvias comprende de noviembre a abril, con temperaturas diurnas de más de 22°C, mientras que las nocturnas alcanzan los 13°C. El invierno es más seco y frío, extendiéndose de mayo a octubre con temperaturas que oscilan entre los 4 y 8°C durante la noche. La humedad relativa excede el 50% a lo largo del año. Florece en abril y mayo (Hennessy y Hedge, 1989; Cash, 1991).

**I. 1. d. Las semillas de las orquídeas.**

Un aspecto fundamental para cualquier consideración acerca de la germinación de las orquídeas, su desarrollo y crecimiento, son sus semillas. En Europa durante muchos años, aparentemente se desconoció la existencia de las semillas de las orquídeas. Sin embargo, en Indonesia, Georgius E. Rumphius (1627-1702) describió dichas semillas mucho antes que los botánicos europeos (de Wit, 1977 citado por Arditti, 1984). Aún después del descubrimiento de las semillas de orquídeas en Europa (a mediados del siglo XVIII) la creencia de que éstas no eran viables o por lo menos incapaces de germinar prevaleció durante muchos años. En 1802, el botánico inglés R. A. Salisbury reportó la germinación de semillas de las orquídeas *Orchis morio* L. y *Limodorum verecundum* Salisb. (ahora *Bletia verecunda* (Salisb.) R. Br.). Después muchos otros botánicos observaron y describieron las plántulas provenientes de semillas de orquídeas (Arditti, 1984).

Las orquídeas poseen probablemente las semillas más pequeñas de las plantas con flores, semejantes sólo a las de la familia Burmanniaceae, las Begoniaceae y algunas plantas parásitas (Bechtel, *et al.*, 1992). Las semillas de orquídeas tienen apariencia de polvo y varían de 0.25 a 1.2mm de largo por 0.09 a 0.27 mm de ancho; una sola semilla tiene un peso del orden de 0.3 a 14 µg (Arditti, 1967a). El número de semillas producidas por fruto o cápsula

compensa su diminuto tamaño. Dependiendo de la especie, una sola cápsula de orquídea puede contener desde 1,300 hasta 4,000,000 de semillas (Arditti, 1992) Tal es el caso de la orquídea *Cycnoches chlorochilon*, de la cual, una simple cápsula puede llegar a contener hasta 3,932,948 semillas (Bechtel *et al.* , 1992).

Las orquídeas se clasifican en dos grandes grupos dependiendo de la estructura de sus semillas (Stimart y Ascher, 1981). El primero comprende aquellas especies cuyas semillas poseen embriones generalmente diferenciados con un cotiledón rudimentario y un endospermo. El segundo, al cual pertenecen la mayoría de las orquídeas (entre ellas *Paphiopedilum* y *Phragmipedium*), incluye a las especies con semillas que poseen un embrión indiferenciado, esférico, rodeado por una delgada cubierta seminal, la cual es frecuentemente transparente y algunas veces pigmentada. Generalmente no hay endospermo ni cotiledones, sino una masa de células con escasa diferenciación (Arditti, 1967a, 1984; Ernst, 1974). El embrión está formado por células isodiamétricas (desde ocho hasta 100), con un citoplasma densamente granulado y un núcleo conspicuo (Arditti, 1967a). En dicho embrión están presentes reservas alimenticias, principalmente lípidos, proteínas y carbohidratos. Sin embargo, las semillas aparentemente carecen del metabolismo adecuado para utilizar sus propias reservas de carbohidratos en la germinación (Arditti, 1979 citado por Ernst y Rodríguez, 1984; Vellupillai *et al.*, 1997). A veces el embrión falta y la semilla no es fértil aunque parezca normal (Harrison y Arditti, 1972) Mientras que el embrión mantiene siempre una forma esférica o globular, la forma de la cubierta seminal es variable, pudiendo ser elíptica, fusiforme, redonda o globular, puede ser mucho más grande que el embrión o casi del mismo tamaño, angular o redondeada; transparente, translúcida u opaca. La cubierta seminal en *Selenipedium* es esclerótica, mientras que las de *Cypripedium*, *Paphiopedilum* y *Phragmipedium* son reticuladas. En algunas especies la cubierta seminal puede contener sustancias capaces de inhibir o retardar la germinación como el ácido abscísico (Arditti, 1967a; Van Waes y Debergh, 1986).

Debido a su estructura, las semillas de orquídeas son muy ligeras y capaces de flotar, por lo que pueden viajar grandes distancias por aire o a través de corrientes de agua; también pueden ser transportadas por hormigas y pájaros (Arditti, 1967a).

### I. 1. e. Germinación asimbiótica.

En la naturaleza las semillas de orquídeas germinan y se desarrollan exitosamente sólo después de haber sido infectadas por un hongo (Arditti, 1967a, 1979, 1982; Arditti y Harrison, 1977; Arditti y Ernst, 1984; Stewart, 1988; Goh, 1990). Este hongo generalmente se asigna al género *Rhizoctonia* y provee al embrión de nutrientes necesarios para la germinación y desarrollo temprano (Ernst y Rodríguez, 1984). Esta asociación fue descubierta por el botánico francés Noel Bernard en 1899 al efectuar observaciones en plántulas de *Neottia* y notar que la infección por el hongo era un requisito para la germinación (Arditti, 1967a). Esto constituyó la base de un sistema práctico de germinación de semillas utilizando el hongo, al que se llamó método simbiótico. Basado en estos estudios de interacción simbiótica entre las orquídeas y el hongo, Bernard realizó los primeros experimentos encaminados a lograr la germinación de las semillas sin la presencia del hongo (Ospina, 1996). Más tarde, el trabajo del micólogo alemán Hans Burgeff describió detalladamente cómo las semillas de orquídeas podían germinar *in vitro* en un medio de agar que contenía un extracto del tubérculo de *Orchis*, llamado “salep”, probando que el hongo adecuado estaba presente. “Es más, orquídeas diferentes requerían de un hongo diferente y particular” (Stewart, 1988). Este método se utilizó principalmente en Inglaterra por cultivadores de orquídeas durante muchos años. Lewis Knudson (1884-1958) profesor de Fisiología Vegetal en la Universidad de Cornell, E.U.N.A., desarrolló métodos de germinación asimbiótica colocando semillas de orquídeas en medios de cultivo adecuados (Knudson, 1921, 1922, 1946). En 1922, Knudson analizó el “salep” y descubrió que consistía de 48% de mucilago, 27% de almidón, 5% de proteína, algunos azúcares y minerales solubles (Arditti, 1967a). Argumentó que la acción del hongo en el medio de cultivo de Burgeff consistía en convertir el almidón del “salep” en azúcares simples los cuales podía utilizar la orquídea (Stewart, 1988), proponiendo la hipótesis de que el hongo proporcionaba a la semilla una fuente de carbohidratos por la descomposición de polisacáridos (Ospina, 1996). Asimismo, Knudson (1925) descubrió que las semillas eran capaces de germinar sin necesidad del hongo en un medio de cultivo relativamente sencillo con las proporciones adecuadas de azúcares y nutrientes minerales esenciales. Como resultado de estos estudios, Knudson propuso un nuevo método de cultivo asimbiótico que desplazó al antiguo procedimiento simbiótico (Harrison y Arditti, 1972).

El primer medio de cultivo utilizado por Knudson para la germinación asimbiótica de semillas de orquídeas era una modificación de la fórmula propuesta por el fisiólogo vegetal W. Pfeffer, y fue llamado medio B ("Knudson B") Este era y sigue siendo un medio de cultivo razonablemente bueno, pero Knudson lo mejoró y publicó su solución C ("Knudson C") en 1946, la cual se ha utilizado ampliamente para la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de orquídeas (Arditti y Krikorian, 1996).

Utilizando los medios básicos de Knudson, muchos investigadores han estudiado los efectos de éste, o los requerimientos para una variedad de factores en la germinación de las orquídeas (Withner, 1959b; Arditti, 1967a, 1979, Fast, 1964, 1967, 1976 y Stoutamire, 1974 citados por Arditti y Ernst, 1984). Con el tiempo el método de Knudson fue optimizado y en algunos casos adaptado a los requerimientos específicos de determinados géneros y especies incluso, muchos autores han sugerido medios de cultivo completamente diferentes al de Knudson, particularmente exitosos para ciertas especies o utilizados en determinados estadios de crecimiento. Entre estos se pueden mencionar los de Burgeff (1936), Vacin y Went (1949), Thomale (1954) y Murashige y Skoog (1962). Estos medios de cultivo generalmente contienen una fuente de carbohidratos, un rango de sales minerales y agar. Muchos también contienen vitaminas, aminoácidos, reguladores de crecimiento o extractos naturales como pulpa de plátano, agua de coco y papa entre otros.

A pesar de que muchas semillas de orquídeas pueden germinar y desarrollarse en éstos y muchos otros medios de cultivo, algunos géneros y especies son más difíciles de germinar (Withner, 1959a; Arditti, 1967a; Arditti y Ernst, 1984). *Cypripedium*, *Paphiopedilum*, *Phragmipedium* y *Selenipedium* pertenecen a un grupo con estas características (Arditti y Harrison, 1977; Pierik *et al.*, 1988). La propagación de *Paphiopedilum* por semilla es incierta; así como la germinación puede ser satisfactoria, también puede no serlo y sólo unas semillas pueden germinar, o bien los protocormos pueden morir después de algún tiempo (Flameé, 1978). Es por esto, que las semillas de *Paphiopedilum* se siembran generalmente en soluciones o medios nutritivos específicos, aunque pueden llegar a germinar en la comúnmente utilizada solución Knudson C (Fast, 1971). Los medios nutritivos más utilizados para dicho género se indican en la Cuadro 1.

Se han realizado pocos estudios respecto a la germinación en *Paphiopedilum* por tres razones principales: el tiempo entre la polinización y la dehiscencia del fruto (9-12 meses), el escaso abastecimiento de semillas y la influencia de factores desconocidos en la germinación (Pierik *et al.*, 1988).

Si se considera que en la familia Orchidaceae el número de semillas por fruto o cápsula es muy alto, cientos, incluso miles de plántulas pueden obtenerse en el laboratorio a partir de un solo fruto; en la naturaleza sólo una, entre miles, podría germinar y llegar a la floración (Withner, 1959a; Arditti, 1967a). La germinación de las semillas de orquídeas puede tomar desde 7 hasta 235 días después de que las semillas se colocan en alguno de los muchos medios de cultivo existentes. La formación de las plántulas puede ocurrir entre 50 a 724 días según la especie, y el desarrollo posterior en 4.2 a 31.5 meses más. Las plántulas pueden florecer en 1-11 años (Arditti, 1992).

Cuadro 1. Principales medios nutritivos utilizados para la germinación *in vitro* de *Paphiopedilum*.

Medio	Principales elementos nutritivos (en milimoles)											Características	Referencia
Burgeff N <sub>3</sub> f	Nitrato	Amonio	Fosfato	Sulfato	Cloruro	K	Mg	Ca	Citrato	Fe	Mn	Al adicionar extracto de hongos, mejora el crecimiento de las plántulas	Burgeff, 1936
Thomale GD	10.66	5.5	2.2	2.16	-	6.16	0.74	-	-	0.07	-	La glucosa y fructosa sustituyen como fuentes de carbohidrato a la sacarosa	Thomale, 1954
Knudson C	8.4	7.6	1.8	4.8	-	1.8	1.0	4.2	-	0.09	0.34	Se utiliza con aditivos orgánicos y compuestos sintéticos orgánicos, incluyendo vitaminas o reguladores de crecimiento	Knudson, 1946
RE	11.57	7.27	2.2	1.22	-	6.16	0.74	-	-	0.07	-	Utiliza como fuente de carbohidratos la fructosa, y la adición de plátano y carbón veg. activado para desarrollo de plántulas	Emst, 1980

### I. 1. f. Cultivo *in vitro* de semillas maduras (fruto dehiscente) y cultivo *in vitro* de semillas inmaduras (fruto no dehiscente).

Cuando se van a cultivar semillas de orquídeas existen dos opciones. La primera consiste en dejar madurar el fruto o cápsula, permitiendo que alcance la dehiscencia o abra de forma natural, entonces la semilla se colecta y se siembra o se almacena. A este método se le llama cultivo de semillas secas o semillas maduras y se identifica por sus iniciales en inglés DSC (dry-seed culture). Una desventaja del método es que las semillas no se mantienen libres de patógenos después de que la cápsula ha abierto y éstas deben desinfectarse superficialmente antes de cultivarse. Esta labor es intensiva, aumenta el riesgo de contaminación y puede incrementar el tiempo entre la polinización y la producción de plántulas. Asimismo, algunas de las semillas pueden morir durante el proceso de desinfección (Rhodehamel, 1994). Después de la polinización las cápsulas de las orquídeas pueden tardar en abrir unas pocas semanas, muchos meses o hasta un año (Stewart, 1988). Para coleccionar semillas provenientes de un fruto dehiscente, hay que observarlo cuidadosamente cercano a la dehiscencia, éste generalmente comienza a cambiar de color, de verde a amarillo o café. Se puede colocar una envoltura o bolsa de papel debajo o alrededor del fruto o cápsula para ayudar a rescatar las semillas en caso de que ésta abra repentinamente. Las semillas secas o maduras también pueden coleccionarse cosechando una cápsula que está cercana a la dehiscencia colocándola en un recipiente o frasco cubierto con una red de nylon o bien, en una bolsa de papel en un lugar seco; la cápsula abrirá naturalmente y liberará sus semillas (Rhodehamel, 1994). Las cápsulas o semillas de orquídeas no deben coleccionarse en recipientes o bolsas de plástico ya que este material retiene humedad que favorece la formación y desarrollo de hongos que dañan a la semilla.

La segunda opción parte del hecho de que las semillas pueden crecer *in vitro* aunque provengan de frutos o cápsulas verdes, no dehiscentes o inmaduras, de ahí el nombre que en ocasiones se les da de semillas "inmaduras" (Arditti, 1992). De hecho, deben existir embriones viables dentro de un fruto en aproximadamente dos tercios del tiempo transcurrido entre la polinización y la dehiscencia natural de la cápsula (Rhodehamel, 1994). Con base en esto se desarrolló un segundo método para cultivar semillas de orquídeas que consiste en cosechar las semillas antes de que el fruto comience a abrir y se conoce como cultivo de la cápsula verde o GCC por sus iniciales en inglés (green-capsule culture). Esta técnica de germinar *in vitro* semillas "inmaduras" en condiciones asépticas se conoce también como cultivo de óvulos, de

embriones y de cápsula o fruto verde. La técnica ha sido muy aceptada entre los cultivadores de orquídeas y se está utilizando cada vez más como un medio para ahorrar tiempo y obtener plántulas de especies difíciles de propagar (Withner, 1974b; Sagawa, 1990). Las ventajas que tiene sobre el DSC son: a) el interior de la cápsula está libre de patógenos por lo que no es necesario desinfectar las semillas antes de sembrarlas, la cápsula sólo se desinfecta por fuera y bajo condiciones asépticas se corta para abrirla y remover sus semillas para su siembra; b) las semillas no se dispersan de la cápsula dehiscente; c) el GCC requiere mucho menos tiempo de trabajo que el DSC (Rhodehamel, 1994).

Un posible riesgo del GCC es el peligro de dispersar algún virus de la planta madre a su descendencia a través del contacto entre las semillas y los fluidos de la cápsula durante el proceso de siembra. Si existe alguna sospecha de que la planta madre está infectada con algún virus, se recomienda seguir el método DSC (Rhodehamel, 1994). Otro problema potencial con el GCC es la dificultad para decidir exactamente cuándo abrir la cápsula verde y el peligro de cosecharla antes de tiempo, lo que disminuiría la probabilidad de encontrar embriones viables ya que el porcentaje de éstos en etapas tempranas de desarrollo es muy pequeño. La viabilidad aumenta en proporción directa al tiempo en que la cápsula permanece en la planta. Generalmente para garantizar mejores resultados y un alto porcentaje de germinación con el GCC es recomendable dejar la cápsula en la planta el mayor tiempo posible. El tiempo de maduración que los embriones requieren antes de cosecharse, es variable pero constante para cada especie (Arditti, 1979). Existen datos publicados que indican los tiempos de maduración de las cápsulas de algunos géneros y especies de orquídeas que pueden servir como guía (Sauleda, 1976; Arditti, 1982; Rhodehamel, 1994), pero hay que tener cuidado ya que muchas veces las condiciones ambientales o de invernadero y las características de la planta madre afectan el periodo de dehiscencia. Sin embargo, si existe alguna duda sobre el tiempo en que las semillas de un género o especie en particular requieren para madurar, es mejor dejar que la cápsula abra naturalmente y utilizar el DSC (Rhodehamel, 1994). Las semillas inmaduras generalmente no pueden almacenarse para sembrarse después (Rhodehamel, 1994; Margaret Ramsay com. pers.).

### **I. 1. g. Reproducción a través de semillas.**

La propagación de plantas por medio de semillas posee ventajas tanto para el cultivador como para el conservacionista. Es la mejor forma de conservar poblaciones naturales ya que se conserva la diversidad genética natural de la especie y se producen plantas fuertes y saludables (Butcher y Marlow, 1989) (Fig. 1) Debido a la variabilidad genética de plantas obtenidas por medio de semillas, no hay garantía para la obtención de plantas de probadas cualidades hortícolas. Sin embargo, desde el punto de vista conservacionista este es un aspecto sumamente importante y deseable en orquídeas en peligro de extinción (Rubluo *et al.*, 1989; Rubluo *et al.*, 1993).

Las principales ventajas de la reproducción a través de semillas son el mantenimiento de la diversidad de los caracteres genéticos y la producción de nuevos genotipos y fenotipos aún si la flor se autopoliniza (Batchelor, 1994). Se pueden encontrar ejemplos de este método de propagación de especies de orquídeas raras o amenazadas tanto en jardines botánicos como en establecimientos comerciales (Butcher y Marlow, 1989).

### **I. 1. h. Técnicas de micropropagación en orquídeas.**

La micropropagación se define como un procedimiento aséptico para la propagación rápida y masiva, asexual o clonal de plántulas a partir de órganos, tejidos y células sin pasar por la etapa sexual (Hartman y Kester, 1983 y Krikorian, 1982, citados por Arditti y Ernst, 1993; Arditti y Krikorian, 1996), y se basa en el principio de que cada célula vegetal generalmente es totipotencial, es decir, posee la habilidad potencial de producir todo tipo de tejidos (Bramwell, 1990). Muchas de las técnicas utilizadas en la propagación de orquídeas a partir de semillas son similares a aquellas utilizadas en la micropropagación (Warren, 1983). Para trabajar con técnicas de micropropagación, es recomendable utilizar el mismo medio de cultivo usado en la germinación de semillas y variarlo conforme sea necesario (Warren, 1983). El cultivo de tejidos es una de las técnicas de micropropagación y se puede practicar por dos razones: primeramente para producir un gran número de variedades comercialmente deseables y en segundo lugar, para trabajos de conservación de especies raras o amenazadas (Warren, 1983). Los métodos del cultivo de tejidos constan de tres fases principales: a) selección y esterilización (si es necesaria) del tejido: si se escoge un pequeño meristemo de un brote, éste

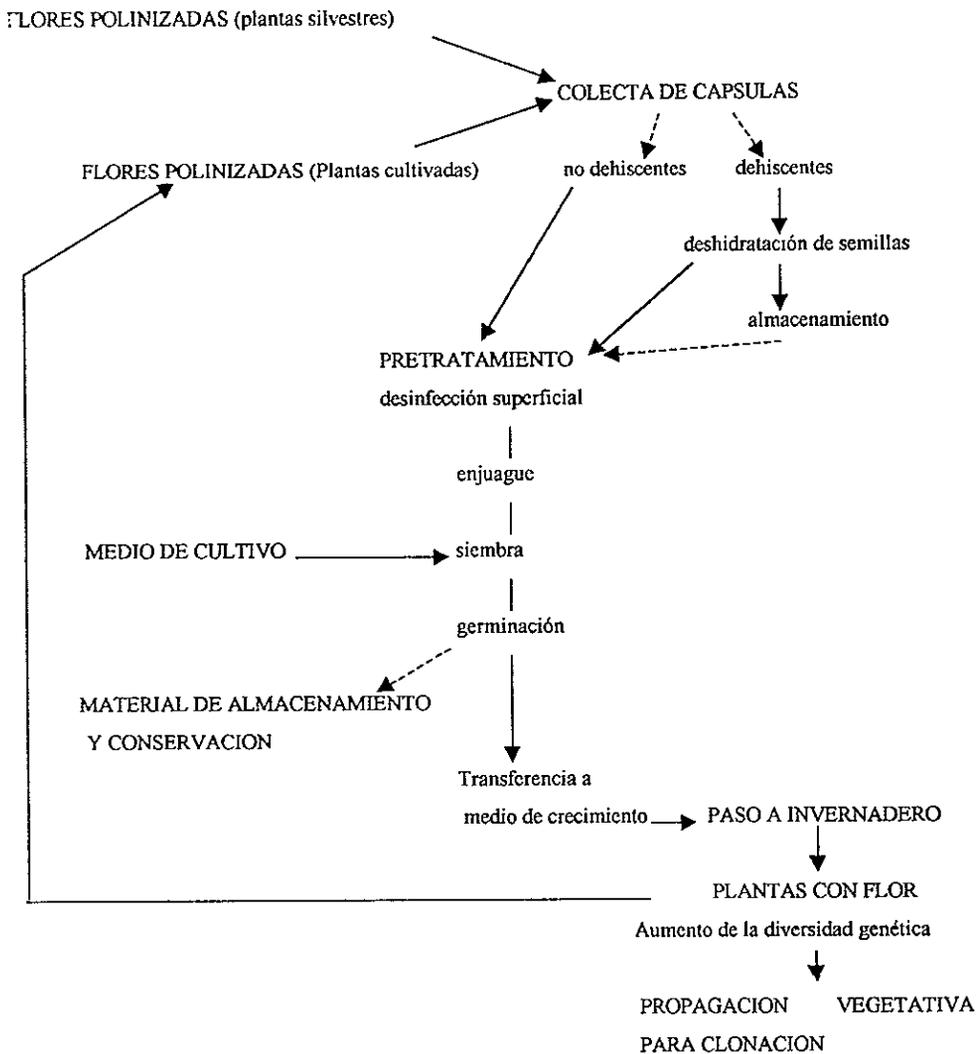


Figura 1. Características del cultivo *in vitro* de orquídeas a partir de semillas.

necesitará una desinfección moderada, mientras que aquellos de puntas de hojas requerirán una esterilización más drástica. Después de lavado en agua esterilizada, el tejido se coloca en el medio de cultivo adecuado. El medio nutritivo generalmente está constituido por sales inorgánicas, una fuente de carbono y algunas vitaminas y reguladores de crecimiento. En muchos casos se agrega un agente gelificante (Debergh *et al.*, 1994). Cuando ocurre la proliferación y crecen plántulas o callos, éstos pueden dividirse y algunos regresarse al medio para una proliferación adicional mientras otras se enraizan; b) multiplicación y, c) enraizamiento y adaptación *in vivo*. Estas etapas incluyen el uso de hormonas vegetales que se utilizan para la manipulación de patrones del crecimiento del tejido vegetal en cultivo. Las hormonas más utilizadas en el cultivo de tejidos son las citocininas y las auxinas; las primeras generalmente promueven la formación de brotes y las segundas promueven la formación de raíces, pero el efecto total depende tanto de las cantidades utilizadas como del balance de unas con otras. La citocinina más utilizada es la 6-benziladenina (BA) o 6-benzilaminopurina (BAP) y entre las auxinas el ácido naftalenacético (ANA). Ambas son activas en concentraciones muy bajas (menos de 10 ppm o miligramos por litro) (Warren, 1983).

En las orquídeas la principal vía de propagación asexual fué por mucho tiempo la división de plantas, pero es probable que hayan sido las primeras plantas hortícolas en ser propagadas mediante el cultivo de tejidos, o por lo menos, a través de métodos asépticos (Arditti, 1977; Capellades *et al.*, 1991). Los primeros reportes de la utilización de técnicas de cultivo de tejidos en orquídeas fueron los de Rotor (1949, citado por Goh, 1990). Al observar que se podían desarrollar plántulas de yemas o inflorescencias en *Phalaenopsis*, Rotor cultivó nodos de escapos florales *in vitro* y obtuvo algunas plántulas. Sin embargo el crédito de lograr una propagación clonal masiva en orquídeas, fue para el biólogo francés Georges Morel en 1960. En un intento por producir plantas de *Cymbidium* libres de virus a partir de plantas infectadas, Morel (1960) cultivó ápices de brotes de dicha orquídea en medio Knudson C y observó que emergían muchas plántulas por explante. Más tarde, en 1963, al efectuar las mismas observaciones en otras orquídeas, Morel propuso el "cultivo de meristemas" como una alternativa para la propagación vegetativa de las orquídeas (Murashige, 1990). Después de esto los métodos de cultivo de tejidos en orquídeas fueron ampliamente utilizados con diferentes explantes y tipos de medios (Bertsch, 1967; Morel, 1971; Arditti *et al.*, 1972; Mosich, Ball y Arditti, 1973; Morel, 1974; Murashige, 1974; Sagawa y Kunisaki, 1982; Wang,

1988; Arditti y Ernst, 1993), y muchos géneros de orquídeas se han clonado exitosamente mediante el cultivo de tejidos (Arditti y Ernst, 1993). Goh (1990) reporta que en 1974, Murashige enumeró 22 géneros de orquídeas cultivables mediante el cultivo de tejidos, y que Arditti en 1977 enlistó 35 géneros incluyendo algunos híbridos intergenéricos. Numerosas técnicas de propagación clonal en orquídeas han sido resumidas por Sagawa y Kunisaki (1984) así como por Arditti y Ernst (1993)

La micropropagación en los géneros de la subfamilia Cypripedioideae. *Cypripedium*, *Paphiopedilum*, *Phragmipedium* y *Selenipedium*, ha resultado difícil de efectuar (Stewart y Button, 1975; Arditti y Ernst, 1993), sin que se haya desarrollado algún método comercial fácil para su propagación clonal (Sagawa y Kunisaki, 1984). Se han cultivado explantes de *Paphiopedilum*, pero los procedimientos permanecen en un nivel experimental ya que los porcentajes de éxito son bajos. Arditti y Ernst (1993) reportan que el éxito inicial en el cultivo de *Paphiopedilum* fue muy limitado.

#### **1. 1. i. Propagación *in vitro* de protocormos.**

El término protocormo fue acuñado entre 1899 y 1910 por el botánico francés Bernard para designar una etapa de desarrollo del embrión de las orquídeas. Dicho embrión se desarrolla cuando las semillas se ponen bajo la influencia de un hongo micorrízico o cuando se colocan en un medio nutritivo (Morel, 1974). La diferenciación comienza con la formación de pelillos epidérmicos y de un meristemo apical, lo que lleva a la formación del protocormo. En cuanto a su estructura, el protocormo puede ser radial o asimétrico, dependiendo de la especie. Dicho protocormo desarrolla un tejido de conducción, series apicales de hojas y raíces a partir del eje cerca de la base de las hojas (Bechtel *et al.*, 1992). Al cultivar ápices de brotes en *Cymbidium*, Morel (1965) observó que los explantes blanquecinos se tornaban verdes y crecían lentamente formando una estructura esférica semejante a un protocormo (PLB = protocorm like body) desarrollado a partir de una semilla. Este cuerpo se diferenciaba después en grupos de nuevos protocormos desarrollando cada uno, una nueva plántula. Más tarde Morel (1964) descubrió que cuando PLBs de *Cymbidium* eran seccionados en varias partes y transferidos a un nuevo medio de cultivo, cada pedazo regeneraba un grupo de 4 a 5 nuevos protocormos los que se podían dividir de nuevo o dejar para regenerar nuevas plántulas. Este

autor estimó que era posible obtener más de 4 millones de plantas en un año a partir de un solo brote (Goh, 1990). Martínez (1985), reportó la propagación rápida y masiva de *Bletia urbana* a partir de protocormos seccionados, obteniendo brotación múltiple. Un estudio anatómico realizado por Morel (1974) demostró que las divisiones celulares en estos explantes están limitadas a las capas exteriores. Las células generalmente se comienzan a dividir en la capa subepidérmica, a veces más abajo, pero rara vez en la epidermis. Estas divisiones periclinales dan lugar a un pequeño agregado de 2-6 células que aparecen al azar en la superficie del protocormo. Estos agregados de células meristemáticas son muy activos y en pocos días se forman pequeños protocormos. La primera diferenciación que aparece en ellos es la formación de un primordio foliar. Se forman muchos primordios foliares, cada uno con un meristemo axilar y un filamento de procambio pero cada uno permanece aislado y no se desarrolla, después uno de ellos forma un punto de crecimiento. Usualmente los otros son inhibidos o comienzan su desarrollo sólo cuando se cortan; sin embargo, a veces pueden desarrollarse y entonces se forma un protocormo con muchos brotes.

#### **I. 1. j. Los complejos orgánicos y el carbón activado en el cultivo *in vitro* de orquídeas.**

Los productos o extractos naturales y el carbón vegetal activado se pueden adicionar a los medios de cultivo *in vitro* de las orquídeas. Los primeros son utilizados porque contienen sustancias con efectos de hormonas. Se ha observado que el agua de coco puede favorecer el crecimiento de células, tejidos, órganos o plántulas *in vitro* (Arditti y Ernst, 1993). El efecto benéfico del agua de coco se relaciona sin duda a su contenido de reguladores de crecimiento, de los cuales, los más importantes son las citocininas (Letham, 1974; van Staden y Drewes, 1975; citados por Goh, 1990). El rango utilizado es del 10 al 25% (v/v)

El plátano se utilizó por primera vez en Brasil, en un medio para la germinación de semillas (Graeflinger, 1950; citado por Arditti y Ernst, 1993). Desde entonces su uso en los medios de cultivo de plántulas de orquídeas se volvió popular, añadiéndoles pulpa homogeneizada, hecha puré, o simplemente sumergiendo algunas rodajas de plátano en cada frasco con medio de cultivo (Arditti y Ernst, 1993). Otros productos naturales utilizados comúnmente son el jugo de piña y jitomate entre otros. Estos extractos frutales han dado

buenos resultados en el cultivo *in vitro* de orquídeas, ya que son un excelente complemento nutritivo (Warren, 1983) y se pueden esterilizar en el autoclave (Arditti y Ernst, 1993).

Robert Ernst en la Universidad de California, fue el primero en adicionar el carbón activado a medios de cultivo para plántulas de orquídeas y encontró que plántulas de *Paphiopedilum* y *Phalaenopsis* crecían bien en medios que contenían este aditivo (1974, 1975, 1976). Estos hallazgos condujeron a la utilización de medios de cultivo adicionados con carbón activado para germinación de semillas, cultivo de plántulas y micropropagación (Arditti y Krikorian, 1996)

## I. 2. JUSTIFICACION

Las orquídeas constituyen uno de los grupos taxonómicos más amenazados de extinción en México (SEDESOL, 1994) debido a la destrucción progresiva de su hábitat, así como a la sobrecolecta y el comercio ilegal de ejemplares silvestres. Por esto, es necesario plantear estrategias que permitan su conservación tanto *in situ* como *ex situ*.

Una alternativa para afrontar esta problemática es promover la propagación mediante las técnicas de cultivo *in vitro* a partir de las cuales se pueda obtener material biológico que permita el desarrollo de programas integrales para la recuperación y conservación de especies amenazadas.

Los intentos por germinar *in vitro* semillas y clonar especies del género *Paphiopedilum* han sido parcialmente exitosos. Existen pocos estudios que generen conocimiento acerca de los requerimientos y condiciones óptimos para una buena germinación, desarrollo de plántulas y micropropagación de especies de este género y de otros relacionados.

El conocimiento que de esta investigación se genere podría ser el punto de partida aplicable a tecnologías que permitan el aprovechamiento sustentable de *Paphiopedilum exstaminodium* y *P. caudatum* así como de otras especies que se encuentran en las mismas condiciones de conservación.

### I. 3. OBJETIVOS

#### Objetivo General.

Germinar, mediante las técnicas de cultivo *in vitro*, semillas de *Paphiopedilum exstaminodium* y *P. caudatum*, especies de orquídeas en peligro de extinción.

#### Objetivos particulares:

1. Investigar los tratamientos (medios de cultivo, complejos orgánicos y carbón activado, pH) que favorezcan la germinación y desarrollo *in vitro* de las especies anteriormente señaladas.
2. Comparar la respuesta de germinación *in vitro* de semillas provenientes de fruto no dehiscente con la de semillas provenientes de fruto dehiscente.
3. Estimar el tiempo requerido para la formación y desarrollo de plántulas.
4. Promover el cultivo *in vitro* de protocormos seccionados para obtener brotación múltiple.
5. Establecer en condiciones de invernadero las plántulas generadas *in vitro*.

## II. MATERIALES Y METODOS

### II. 1. Germinación asimbiótica.

#### II. 1. a. Material biológico.

Debido a la disponibilidad de material, para *P. exstaminodium* se utilizaron semillas maduras de frutos dehiscentes y semillas provenientes de frutos verdes no dehiscentes. Para *P. caudatum* se usaron sólo frutos dehiscentes provenientes de ejemplares de los invernaderos de la Asociación Mexicana de Orquideología (AMO) (no. colecta: 4776, 4777, 4454 y 7115).

Con una navaja esterilizada, las cápsulas verdes o inmaduras se cortaron de la planta madre aproximadamente al octavo mes después de la polinización.

#### II. 1. b. Almacenamiento de semillas.

Después de cortarlos de la planta madre, los frutos dehiscentes se colocaron en bolsas de papel en un lugar fresco y seco (15-20 ° C) para la liberación total de las semillas. Las semillas ya liberadas se retiraron con una espátula y se colocaron en un sobre de papel dentro de un frasco con cloruro de calcio anhidro, en un lugar fresco y seco durante 5-6 días para disminuir la humedad presente en las semillas (Arditti, 1982). Para su conveniente conservación, las semillas deshidratadas se almacenaron en frascos herméticamente sellados y se colocaron en refrigeración (4-6 °C).

#### II. 1. c. Medios de cultivo.

Para la germinación de semillas maduras e inmaduras de ambas especies se utilizaron los siguientes medios de cultivo. medio Knudson "C" (Knudson, 1946) modificado (KCm) con hierro quelado de acuerdo a Murashige y Skoog (1962), adicionado con 250 mg/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y con los micronutrientes del medio Heller (1953) sin hierro de acuerdo a Dalla Rosa y Laneri (1977) (ver Apéndice 1); y el medio RE (Ernst, 1980) modificado con 10g/l de agar (ver Apéndice 2). Ambos adicionados con agua de coco, pulpa de plátano y carbón activado según el tratamiento utilizado para la evaluación de la germinación (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Tratamientos utilizados para evaluar la respuesta de germinación de semillas maduras de *P. exstaminodium* y *P. caudatum* cultivadas en oscuridad,  $26 \pm ^\circ\text{C}$ .

TRATAMIENTO	MEDIO DE CULTIVO
1	Knudson C modificado = KCm (Dalla Rosa y Laneri, 1977).
2	KCm + agua de coco (100 ml/l) = K19.
3	KCm + plátano 8% (p/v) + carbón vegetal activado 0.2% = K43.
4	RE (Ernst, 1980).
5	RE + agua de coco (100 ml/l) = REC.
6	RE + plátano 8% (p/v) + carbón vegetal activado 0.2 % = REP.

Para la preparación del medio KCm se elaboraron dos soluciones concentradas de macronutrientes y micronutrientes, así como de hierro quelado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ). El  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  se pesó y diluyó directamente al preparar el medio. Las soluciones concentradas se conservaron a  $6^\circ\text{C}$  en botellas de vidrio, para tomar las alícuotas necesarias y llevarlas a los volúmenes y concentraciones deseadas.

Todos los medios se ajustaron a un pH de  $5.0 \pm 0.2$  utilizando soluciones de HCl y NaOH 0.1 y 0.5 N y se distribuyeron en frascos de boca ancha con capacidad de 120ml, conteniendo 30 ml de medio de cultivo, los que se esterilizaron en un autoclave a  $121^\circ\text{C}$  y  $1.5 \text{ kg/cm}^2$  durante 15 minutos. La formulación de los medios está descrita en los Apéndices 1 y 2.

#### **II. 1. d. Complejos orgánicos.**

Agua de coco. Se obtuvo de cocos del mercado local, con cáscara café y utilizando un coco cada vez, el cual se abrió y se extrajo el líquido que se filtró a través de una gasa. Se calentó en una parrilla hasta hervir durante diez minutos. Se dejó enfriar para la precipitación de las proteínas y posteriormente se filtró a través de papel Whatman 1. Se incorporaron 100 ml de agua de coco por cada litro de medio de cultivo.

Extracto de plátano. Se utilizó plátano tabasco maduro, con cáscara amarilla y sin manchas. Después de retirar la cáscara, se pesaron 80 g de plátano por cada litro de medio de cultivo y se homogeneizó en una licuadora con un poco de agua destilada aproximadamente durante un minuto, agregándose después al medio.

### **II. 1. e. Desinfección de semillas.**

Las semillas maduras se sometieron a pretratamientos en  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  5% (p/v) durante dos, cuatro y seis horas para aumentar la permeabilidad de la cubierta seminal (Van Waes, 1986), sin embargo no hubo diferencia en la respuesta de germinación entre estos tratamientos con respecto del tratamiento tradicional (20-30 minutos en  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ ) por lo que en siembras posteriores, las semillas sólo se sometieron a éste último tratamiento.

Las semillas maduras, provenientes de frutos dehiscentes, se desinfectaron con una solución de hipoclorito de calcio  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  al 7% (30-35% de cloro disponible), más 1-2 gotas/100ml del emulsificante Tween 80 durante 20-30 minutos en agitación. La solución se decantó y se preparó cada vez que se utilizaba. En la campana de flujo laminar, con una coladera, las semillas se sometieron a tres enjuagues con agua destilada esterilizada

Los frutos verdes se desinfectaron superficialmente antes de sembrar sus semillas *asépticamente*. Después de retirarle todos los restos florales, el fruto o cápsula se lavó con agua y jabón tallándose con un cepillo suave; se desinfectó con hipoclorito de sodio doméstico (6% de cloro activo) al 50% (v/v) más 2-3 gotas/100 ml de Tween 80 y se mantuvo en agitación durante 15-20 minutos. En condiciones asépticas la cápsula se enjuagó y sumergió de 3-5 minutos en agua destilada esterilizada (Arditti, 1982). Después de sumergirla en etanol al 70% la cápsula se flameó y se procedió a la siembra

### **II. 1. d. Siembra.**

Tanto las semillas maduras como las inmaduras, se sembraron en los frascos de cultivo bajo condiciones de asepsia en una campana de flujo laminar. En cada siembra, la campana se encendió por lo menos media hora antes y se desinfectó con alcohol etílico industrial 96% al igual que el resto del material, como frascos de cultivo e instrumental (pinzas, espátulas, navajas, etc.). Las semillas maduras se tomaron de la coladera con una espátula y se depositaron en el medio de cultivo dispersándolas mediante una jeringa con 0.5ml de agua destilada esterilizada. Para la siembra de semillas inmaduras, el fruto o cápsula verde se abrió longitudinalmente con una navaja y pinzas de disección. Las semillas inmaduras se colocaron en los frascos con medio de cultivo de la misma manera que las semillas maduras.

### II. 1. e. Condiciones de cultivo.

Para la germinación de las semillas, los frascos se colocaron en condiciones de oscuridad, a  $26 \pm 2$  °C. Cuando a partir de los embriones de las semillas se obtuvieron protocormos blanquecinos de aproximadamente 3 mm y con 2 pequeñas hojas, los frascos fueron transferidos a condiciones de luz tenue (500 lux), fotoperíodo de 16 hrs. y  $26 \pm 2$  °C.

### II. 1. f. Cuantificación de la germinación.

Para evaluar la germinación de las semillas, se consideró el porcentaje y el índice de germinación, este último modificado de Arditti (1967b) según Pierik *et al.*, 1988.

El proceso de germinación se dividió en cuatro etapas o categorías:

- Etapa no germinativa = 0 (a) → no ocurre un crecimiento del embrión (Fig.2a).
- Etapa de pregerminación = 1 (b) → el embrión crece o se hincha sin romper la cubierta seminal (Fig.2b).
- Etapa de germinación = 2 (c) → el embrión emerge de la cubierta seminal (Fig.2c).
- Etapa de protocormo = 3 (d) → el embrión está completamente fuera de la cubierta seminal (Fig. 2d-f).

Las letras a, b, c y d indican la frecuencia de cada etapa de crecimiento.

El porcentaje e índice de germinación se calcularon de la siguiente manera:

$$\% \text{ germinación} = \frac{(b+c+d)100}{a+b+c+d} \quad \text{índice de germinación} = \frac{(1b+2c+3d)10}{a+b+c+d}$$

De esta manera, el índice de germinación, se deriva del porcentaje de cada etapa de desarrollo (Pierik *et al.*, 1988).

Para realizar las observaciones y cuantificar la germinación las semillas se sembraron en cajas de petri con ayuda de un microscopio de disección. Los tratamientos utilizados se describen en la Cuadro 2. Cada tratamiento comprendió 4-5 repeticiones con al menos 25 semillas por repetición

La evaluación para semillas de fruto verde se realizó bajo las mismas condiciones y tratamientos que para semillas de fruto dehiscente.

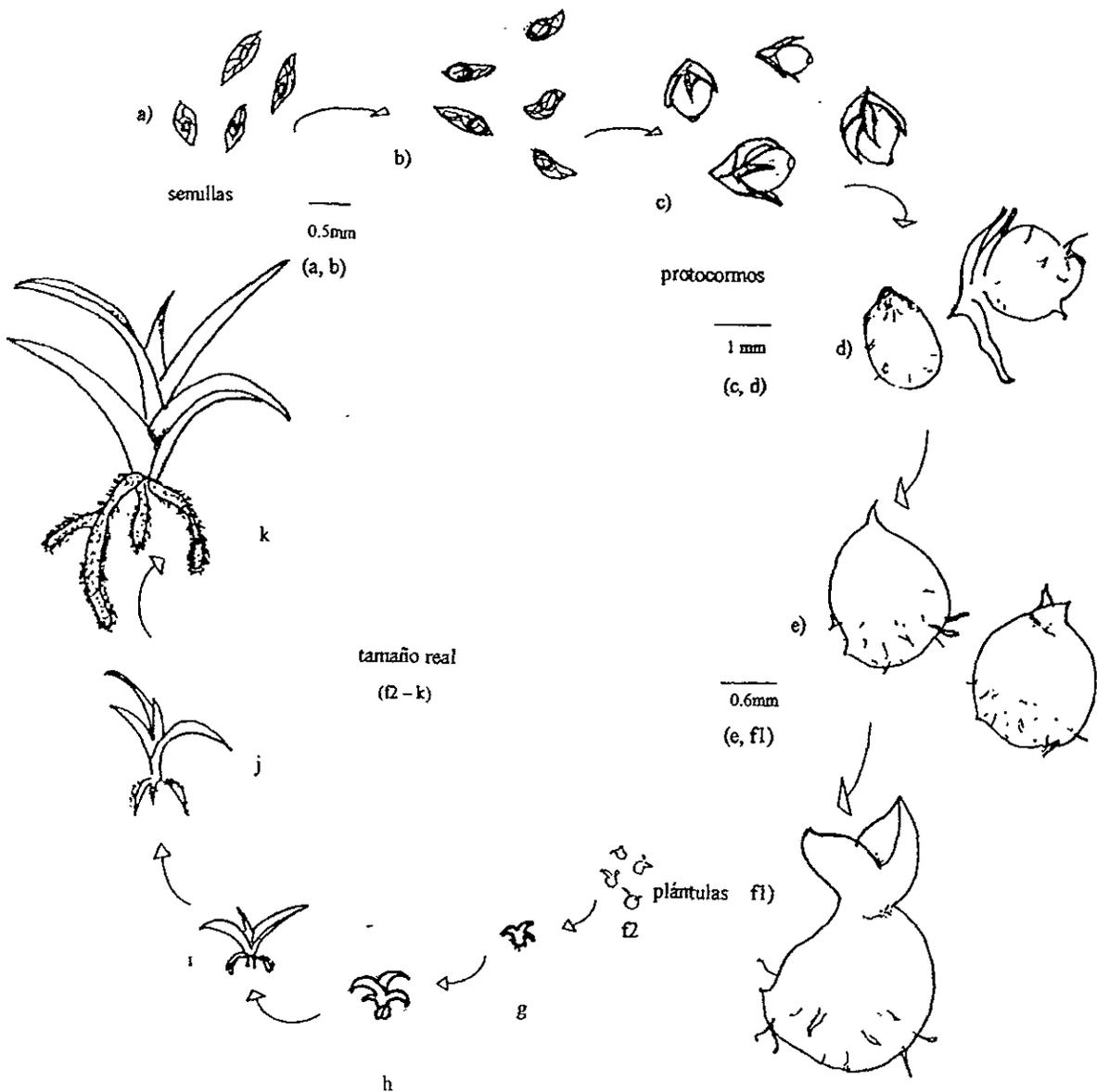


Figura 2. Desarrollo normal en *Paphiopedilum exstaminodum* y *P. caudatum* desde semilla hasta plántula: a) etapa no germinativa; b) etapa pregerminativa (2 semanas); c) etapa germinativa (4 semanas); d-e) etapa de protocormo (2 meses); f-k) etapa de plántula (desde los 3 hasta los 18 meses).

## II. 2. Desarrollo de plántulas de *Paphiopedilum caudatum*.

Sólo en *P. caudatum* se evaluó la respuesta de crecimiento de plántulas ante varios tratamientos debido a que se contaba con mas material biológico de esta especie para efectuar este evaluación. Se utilizó como medio de cultivo basal el Knudson C modificado (KCm), sin y con carbón vegetal activado (0.2 %) y adicionado o no con extractos orgánicos como agua de coco (100 ml/l) y plátano a diferentes concentraciones. Para cada uno de los siguientes tratamientos se utilizaron dos valores de pH: 5.0 y 6.0

Tratamiento:

- 1) KCm (medio basal) (Apéndice 2).
- 2) KCm + 4 % plátano + carbón vegetal activado.
- 3) KCm + 8 % plátano + carbón vegetal activado.
- 4) KCm + 12 % plátano + carbón vegetal activado.
- 5) KCm + agua de coco.
- 6) KCm + agua de coco + carbón vegetal activado.
- 7) KCm + carbón vegetal activado.

Se cultivaron 8 plántulas de 2 a 4 cm de altura en cada frasco y 4 frascos por tratamiento. Los frascos de cultivo se colocaron en condiciones de penumbra (500 lux) bajo un fotoperíodo de 16 h y una temperatura de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ .

## II. 3. Secciones de protocormos.

Se utilizaron protocormos obtenidos a partir de semillas, considerandose aquéllos que presentaban dos pequeñas hojas y un tamaño aproximado de 3 mm. Se utilizaron dos medios de cultivo: el primero fué el Knudson C modificado (KCm), líquido y sólido (Apéndice 1) adicionado con BA en concentraciones de 1, 5 y 10 mg/l.; para la citocinina se preparó una solución concentrada  $1 \times 10^{-3}$  M; el segundo medio de cultivo fue el MS (Murashige y Skoog, 1962) líquido y sólido (Apéndice 3); además de un control se utilizaron las siguientes concentraciones y combinaciones hormonales. BA (0.5 mg/l); BA (0.5 mg/l) + ANA (0.1 mg/l), BA (0.5 mg/l) + ANA (1 mg/l). Los medios de cultivo se prepararon en vasos de precipitados para cada concentración hormonal, aforando con una probeta a la cantidad deseada después de agregar las alícuotas de la hormona. El pH se ajustó a 5.0 para el medio

KCm y a 5.7 para el MS. Sólo se adicionó agar a los medios sólidos para los cuales se ocuparon 4 tubos de ensaye de 25 x 150 mm por concentración hormonal, cada uno con 5 ml de medio. Para el cultivo de secciones de protocormos en medios líquidos se utilizaron matraces de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo.

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a una presión de 1.5 kg/cm<sup>2</sup> a 120°C durante 15 minutos.

En la campana de flujo laminar, los protocormos a seccionar se depositaron con una espátula estéril, en una caja de petri con un poco de agua destilada esterilizada. Los cortes se efectuaron con ayuda de un microscopio de disección Zeiss, una navaja con mango de acero inoxidable y unas pinzas de relojero que también sirvieron para colocar las secciones en los recipientes de cultivo. Los cortes se hicieron en forma longitudinal, sembrándose 3 protocormos seccionados, es decir, 6 explantes por cada tratamiento. Las condiciones de cultivo fueron: fotoperiodo de 16 hrs. luz (1000 lux) y 28± 2°C. Los tratamientos con medio líquido se colocaron en una mesa de agitación a 100 r. p. m

#### **II. 4. Acimatación de plantas a condiciones de invernadero.**

Las plántulas obtenidas de la germinación *in vitro*, de 6-8 cm con raíces bien desarrolladas se transfirieron a condiciones de invernadero, probándose dos tipos de sustratos y recipientes, para lo cual se siguieron los siguientes pasos:

-Paso 1. Las plántulas se extrajeron de los frascos de cultivo y se lavaron con agua corriente tibia para remover el agar adherido a sus raíces. Posteriormente se colocaron en una solución de Agrimicin (2g/20 lt.) durante 15-20 minutos y se escurrieron sin enjuagar colocándolas sobre toallas de papel por 10-15 minutos para eliminar el exceso de humedad y permitir un secado superficial, cuidando que las raíces se mantuvieran siempre húmedas.

-Paso 2 Se probaron dos sustratos. Para el primero (sustrato 1) se preparó una mezcla a partes iguales de *Sphagnum*, perlita y carbón (1: 1: 1) en trozos de 0.5-1 cm y se sumergió en una solución de Physan (5 ml/galón) durante 15 minutos y se escurrió. El segundo (sustrato 2) consistió en una mezcla de musgo y tezontle en trozos de 2 cm que se sumergieron en una solución de Agrimicin (2g/20 lt.) por 20 minutos, después de lo cual se escurrieron cuidadosamente

-Paso 3. El sustrato 1, se colocó en macetas de plástico (9 x 9 cm x 8 cm de altura) sobre una capa de unicel en trozos de 1.5 a 2 cm. El sustrato 2 se colocó en charolas de plástico (30 x 19 cm x 10 cm de altura) con orificios de aprox. 2 cm en la base. Este material se lavó previamente y se colocó en una solución de cloro (50 ml/galón), durante una hora. Una vez escurridas, las macetas se llenaron con el unicel dejando libre un espacio aproximado de 2 cm en la parte superior, donde se colocó la mezcla de *Sphagnum*/perlita/carbón. Las charolas se llenaron con una capa de tezontle de 3 cm en la parte inferior y sobre ésta la capa de musgo de 2 cm

-Paso 4. Con la ayuda de pinzas y espátulas se colocaron en las macetas aproximadamente 10 plántulas en hileras dejando un espacio aproximado de 2 cm entre cada una, mientras que en las charolas se colocaron 20 plántulas formadas en hileras dejando un espacio aproximado de 2 cm entre ellas.

-Paso 5. Las macetas y las charolas se mantuvieron en un invernadero con una humedad relativa de 50 a 70%, una iluminación de 1000 lux durante 12-14 horas por día. Asimismo, se mantuvo un movimiento de aire por medio de un ventilador para mantener el sustrato fresco y aireado.

## II. 5. Análisis estadístico.

Para detectar diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en las variables de respuesta: germinación de semillas maduras de *P. extaminodium* y *P. caudatum*, así como la germinación por tipo de fruto, dehiscente (semillas maduras) y no dehiscente (semillas inmaduras), en *P. extaminodium*, se realizó un Análisis de Varianza de dos factores (ANOVA) y posteriormente una prueba de comparación múltiple de Medias (LSD) de Fisher.

Para evaluar el crecimiento de plántulas de *P. caudatum*, los datos obtenidos también se sometieron a un Análisis de Varianza factorial (ANOVA) y a una prueba de comparación múltiple de Medias (LSD) de Fisher.

Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico *Statistica*, w/ 4.1. Los datos se sometieron a pruebas de normalidad y homogeneidad.

### III. RESULTADOS

#### III. 1. Germinación asimbiótica en *Paphiopedilum exstaminodium* y *P. caudatum*.

Arditti (1967b) reportó que durante la etapa inicial de la germinación de las semillas de orquídeas en general, el embrión se hincha y eventualmente la cubierta seminal revienta. Después, el embrión se desarrolla en un protocormo esférico que más tarde se vuelve ovoide y forma un meristemo apical del cual se originan las hojas. Finalmente aparecen las raíces en la parte basal. Este es el patrón que en términos generales se presenta en las especies en estudio; a continuación se describen de manera más detallada la germinación y el subsecuente desarrollo observados en *Paphiopedilum exstaminodium* y *P. caudatum*:

-Las semillas de ambas especies son muy pequeñas (aprox. 0.5 mm de largo), de color café oscuro y con un embrión sencillo formado por células indiferenciadas y rodeado de una cubierta seminal de apariencia reticular (Figs. 2a y 3a).

-Una vez que las semillas se colocaron en el medio de cultivo y en condiciones *in vitro*, se apreció un aumento de tamaño (hinchamiento) del embrión casi dos semanas después (Fig. 2b). La germinación fue evidente aproximadamente un mes después de la siembra cuando el embrión emergió de la cubierta seminal (longitud aproximada: 1.5 mm) (Figs. 2c y 3b).

-Dos meses después de la siembra el embrión emergió completamente de la cubierta seminal (Fig. 2d) y se desarrolló en un pequeño protocormo blanquecino (2 mm de altura y 1.5 mm de diámetro) con un primordio foliar en la parte superior y rizoides en la base (Fig. 2e).

-A los 3 meses, cuando el protocormo alcanzó una altura de 2.5 mm a 3 mm, se distinguieron dos pequeñas hojas (Fig. 2f) y se pudo observar el tercer primordio foliar 2 semanas después (Fig. 3c). Al transferir los cultivos bajo condiciones de iluminación, los protocormos se tornaron verdes dentro de la primera semana de cultivo en esta condición.

-Alrededor de los 4 meses aumentó el desarrollo foliar (Figs. 2g y 3d), y a los 6 meses se desarrolló el primordio radicular (aprox. 7 mm longitud) (Figs. 2h y 3e).

-A los 9 meses las plántulas sin raíz alcanzaron aproximadamente 1.5 cm y aumentó el número de raíces (Figs. 2i y 3f).

-Con un tamaño aproximado de 3 cm (incluyendo las raíces) la plántula de 11 meses de cultivo presentó hojas nuevas (Fig. 2j).

-Al año y medio las plántulas alcanzaron una altura aproximada de 5 cm y raíces de hasta 1 cm (Figs. 2k y 3g).

-Las plántulas de dos años presentaron hojas de hasta 5 cm y raíces con una longitud de 1.5 cm a 2 cm, llegando a medir hasta 7 cm. En esta etapa las plántulas se transfirieron a condiciones de invernadero (Fig. 3h-i).

En las orquídeas, la germinación *per se* es difícil de definir e inconveniente como parámetro. El aumento en el diámetro de los protocormos se ha utilizado como medida de crecimiento y un indicativo del desarrollo (Vacin y Went, 1949). Sin embargo esto es un indicio inconsistente ya que a veces, las plántulas no se desarrollan normalmente y forman masas amorfas de tejido. Por eso, es necesario un método de cuantificación de crecimiento normal como el índice de germinación. Este índice se deriva del porcentaje de cada estado de desarrollo en un cultivo y constituye una medida verdadera del desarrollo normal de los protocormos. Los datos así obtenidos se pueden someter fácilmente a un análisis estadístico. El índice de germinación se considera una buena medición del desarrollo normal de los protocormos y se utiliza para describir la germinación cualitativamente (Flameé, 1978).

Los índices y porcentajes de germinación se evaluaron después de 12 semanas de incubación de las semillas en condiciones de oscuridad (Cuadros 3-6). Como criterio de germinación se consideró el crecimiento del embrión al romper y emerger de la cubierta seminal (Fig. 2b). En las especies estudiadas la germinación de las semillas comenzó entre las 4 y 6 semanas después de colocarlas en los medios de cultivo. Siguiendo el criterio de Pierik y colaboradores (1988), cuando no se registraba germinación, el índice de germinación era igual a cero; cuando todas las semillas germinaban y alcanzaban la etapa 3, el porcentaje de germinación se consideraba como de 100% y el índice de germinación era igual a 30.

Al comparar la respuesta de germinación de semillas maduras en *P. exstaminodium* (especie 1) y *P. caudatum* (especie 2), mediante la prueba de ANOVA (Cuadro 7) se obtuvo que para índice y porcentaje de germinación se observaron diferencias significativas en cuanto a especies ( $p < 0.0037$  y  $p < 0.0051$ ) y tratamientos ( $p < 0.00001$ ). Sin embargo, la interacción entre especies y tratamientos fue significativa sólo para el índice de germinación ( $p < 0.0081$ )

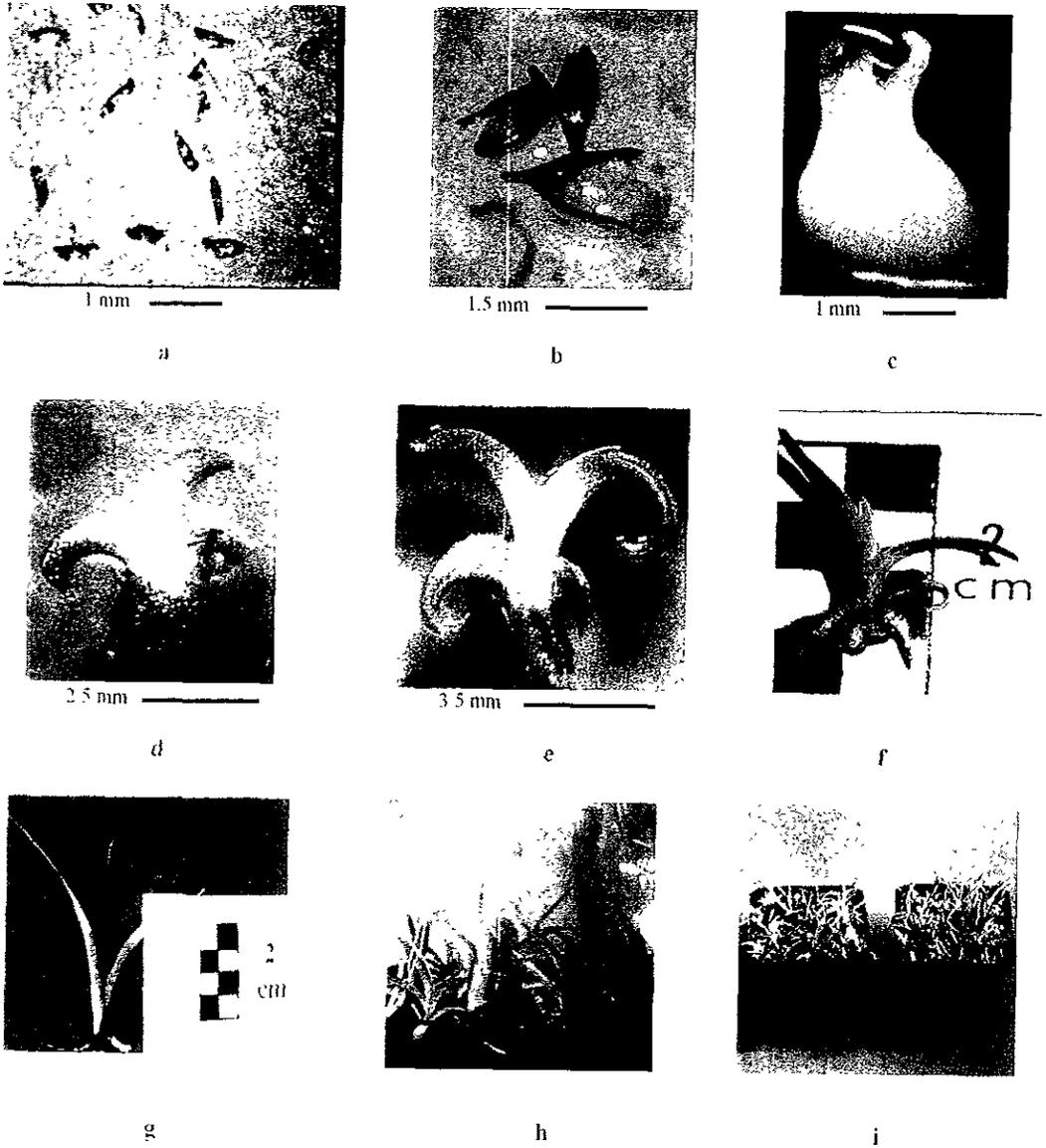


Figura 3. Etapas de desarrollo de plántulas de *P. extaminodum* germinadas *in vitro*: a) semillas antes de germinar; b) semillas en germinación (hinchamiento del embrión y ruptura de la cubierta seminal); c) etapa de protocormo; d-i) etapas de plántula, mostrando el desarrollo foliar y radicular hasta su traslado a invernadero.

pero no para el porcentaje de germinación ( $p \geq 0.05$ ). Al efectuar la prueba LSD de Fisher para índice de germinación (Cuadro 8), se determinó que *P. caudatum* respondió mejor que *P. exstaminodium* ante la mayoría de los tratamientos, incluso la primera especie respondió favorablemente cuando se utilizó el medio KCM sin compuestos orgánicos o carbón activado (tratamiento 1). Los mejores tratamientos para ambas especies fueron el 3, el 6 y el 2 además del tratamiento 1 para *P. caudatum*. El tratamiento que tendió a ser el menos favorable fue el medio RE (tratamiento 4) (Gráfica 1). La prueba LSD de Fisher para el porcentaje de germinación (Cuadro 8), indicó que los mejores tratamientos también fueron el 3, el 6 y el 2 adicionados con extractos vegetales y carbón activado; el tratamiento menos eficiente fue de nuevo el medio RE sin complejos orgánicos (Gráfica 2).

Para la respuesta de germinación de semillas de fruto dehiscente y de semillas provenientes de fruto no dehiscente de *P. exstaminodium*, la prueba de ANOVA (Cuadro 9), detectó diferencias significativas para índice y porcentaje de germinación ( $p < 0.0002$  y  $p < 0.00001$ ) en cuanto a tipo de fruto; lo mismo ocurrió en cuanto a los tratamientos ( $p < 0.00001$  y  $p < 0.00007$ ). Sin embargo, sólo el índice de germinación mostró una interacción significativa entre el tipo de fruto y el tratamiento ( $p < 0.0102$ ), lo que permitió definir una mejor combinación y considerar que la respuesta de uno determina la respuesta del otro.

La prueba LSD de Fisher para índice de germinación (Cuadro 10), determinó que las mejores combinaciones ocurrieron con ambos frutos ante el tratamiento 3 así como con el fruto dehiscente ante el tratamiento 6. Estos dos tratamientos contenían plátano y carbón activado. La respuesta menos favorable ocurrió al combinar semillas inmaduras y el medio RE sin extractos orgánicos (Gráfica 3). El mejor porcentaje de germinación (Cuadro 10; Gráfica 4) se obtuvo con el tratamiento 3, mientras que el tratamiento más deficiente fue de nuevo el 4. Para este parámetro (porcentaje de germinación), al igual que en respuesta por tipo de semillas, tampoco existió interacción entre frutos y tratamientos (Cuadro 9). Esto implica que para el porcentaje de germinación, no existe una mejor combinación que sea significativamente mejor, por lo que los efectos se evalúan por separado. Al haber interacción, se puede comparar la respuesta en conjunto, tanto de ambas especies como de los dos tipos de fruto por tratamiento. Cuando no hay interacción esta comparación no es válida porque la respuesta de las dos especies o frutos ante un tratamiento es similar.

Cuadro 3\*. Índice total ( $\pm$  s. d.) de germinación en semillas maduras de *P. exstaminodium* y *P. caudatum* después de 12 semanas de incubación en oscuridad a  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

TRATAMIENTO	<i>P. exstaminodium</i>	<i>P. caudatum</i>
1	8.87 $\pm$ 3.40	15.20 $\pm$ 3.08
2	11.07 $\pm$ 1.65	14.00 $\pm$ 3.22
3	13.85 $\pm$ 2.26	15.44 $\pm$ 1.97
4	7.12 $\pm$ 2.90	4.96 $\pm$ 1.22
5	9.36 $\pm$ 2.41	9.55 $\pm$ 1.39
6	12.30 $\pm$ 2.41	14.80 $\pm$ 1.60

Cuadro 4\*. Porcentaje total ( $\pm$  s. d.) de germinación en semillas maduras de *P. exstaminodium* y *P. caudatum* después de 12 semanas de incubación en oscuridad a  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

TRATAMIENTO	<i>P. exstaminodium</i>	<i>P. caudatum</i>
1	59.10 $\pm$ 16.25	60.00 $\pm$ 8.00
2	72.00 $\pm$ 6.93	61.20 $\pm$ 9.34
3	82.20 $\pm$ 8.38	68.80 $\pm$ 10.73
4	53.20 $\pm$ 19.47	34.40 $\pm$ 6.69
5	64.00 $\pm$ 16.73	46.87 $\pm$ 9.29
6	71.32 $\pm$ 12.00	76.80 $\pm$ 9.96

Cuadro 5\*. Índice total de germinación ( $\pm$  s. d.) en semillas de fruto dehiscente y no dehiscente de *P. exstaminodium*.

TRATAMIENTO	Fruto dehiscente	Fruto no dehiscente
1	8.87 $\pm$ 3.40	8.01 $\pm$ 2.95
2	11.07 $\pm$ 1.65	10.40 $\pm$ 3.29
3	13.85 $\pm$ 2.26	14.72 $\pm$ 4.90
4	7.12 $\pm$ 2.90	3.61 $\pm$ 2.17
5	9.36 $\pm$ 2.41	4.21 $\pm$ 0.90
6	12.30 $\pm$ 2.41	4.65 $\pm$ 1.21

Cuadro 6\*. Porcentaje total de germinación ( $\pm$  s. d.) en semillas de fruto dehiscente y no dehiscente de *P. exstaminodium*.

TRATAMIENTO	Fruto dehiscente	Fruto no dehiscente
1	59.10 $\pm$ 16.25	32.40 $\pm$ 9.20
2	72.00 $\pm$ 6.93	36.56 $\pm$ 10.67
3	82.20 $\pm$ 8.38	55.79 $\pm$ 17.58
4	53.20 $\pm$ 19.47	23.16 $\pm$ 13.08
5	64.00 $\pm$ 16.73	28.18 $\pm$ 6.61
6	71.32 $\pm$ 12.00	29.94 $\pm$ 3.47

\*Tratamiento: 1=KCM; 2=K19: KCM+agua coco; 3=K43: KCM+plátano y carbón activado, 4=RE; 5=REC: RE+agua de coco, 6=REP: RE+plátano y carbón activado.

Cuadro 7. ANOVA del índice y porcentaje de germinación de semillas maduras de *P. exstaminodium* y *P. caudatum*.

Fuente de variación	Grados de libertad	F calculada		Probabilidad*	
		Índice	%	Índice	%
Especies (E)	1	9.32	8.58	0.0037*	0.0051*
Tratamientos (T)	5	17.35	10.38	0.00001*	0.00001*
Interacción (E x T)	5	3.56	1.75	0.0081*	0.1400

(\*) con 0.05 nivel de significancia.

**Cuadro 8. PRUEBA LSD DE FISHER para índice y porcentaje de germinación de semillas maduras de *P. exstaminodium* (especie 1) y *P. caudatum* (especie 2)**

Especie	Tratamiento	Índice germinación*	Especie	Tratamiento	% de germinación*
2	3	15.44 <sup>a</sup>	-	3	75.5 <sup>a</sup>
2	1	15.2 <sup>ab</sup>	-	6	74.06 <sup>a</sup>
2	6	14.8 <sup>ab</sup>	-	2	66.6 <sup>b</sup>
2	2	14.0 <sup>abc</sup>	-	1	59.55 <sup>bc</sup>
1	3	13.85 <sup>abc</sup>	-	5	55.43 <sup>c</sup>
1	6	12.3 <sup>bcd</sup>	-	4	43.8 <sup>d</sup>
1	2	11.07 <sup>de</sup>	-		
2	5	9.55 <sup>def</sup>	-		
1	5	9.36 <sup>def</sup>	-		
1	1	8.86 <sup>ef</sup>	-		
1	4	7.12 <sup>fg</sup>	-		
2	4	4.96 <sup>g</sup>	-		

(\*) letras diferentes implican valores significativamente diferentes entre sí. Las comparaciones se hicieron sólo entre columnas. Tratamiento 1=KCM, 2=K19: KCM+agua coco, 3=K43: KCM+plátano y carbón activado; 4=RE; 5=REC: RE+agua de coco, 6=REP RE+plátano y carbón activado.

**Cuadro 9. ANOVA del índice y porcentaje de germinación de semillas de fruto dehiscente y no dehiscente de *P. exstaminodium*.**

Fuente de variación	Grados de libertad	F calculada		Probabilidad <sup>a</sup>	
		índice	%	índice	%
Frutos (F)	1	15.79	97.18	0.0002*	0.00001*
Tratamientos (T)	5	13.26	6.81	0.00001*	0.00007*
Interacción (F x T)	5	3.41	0.54	0.0102*	0.743

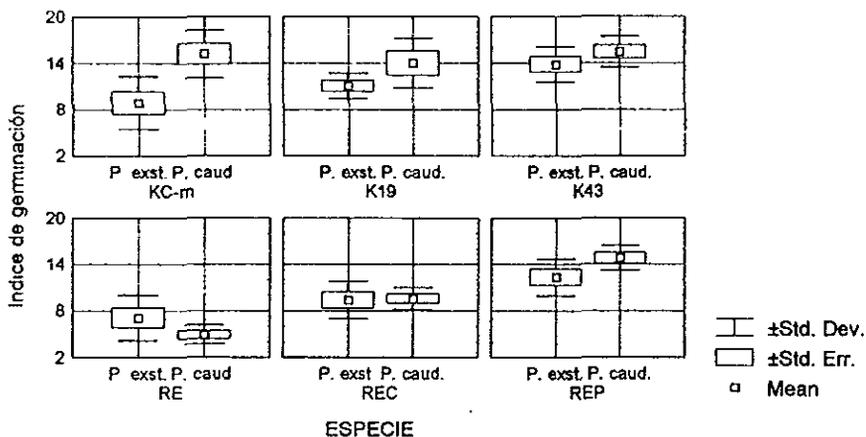
(<sup>a</sup>) con 0.05 nivel de significancia

**Cuadro 10. PRUEBA LSD DE FISHER para índice y porcentaje de germinación de semillas de fruto dehiscente (1) y no dehiscente (2)**

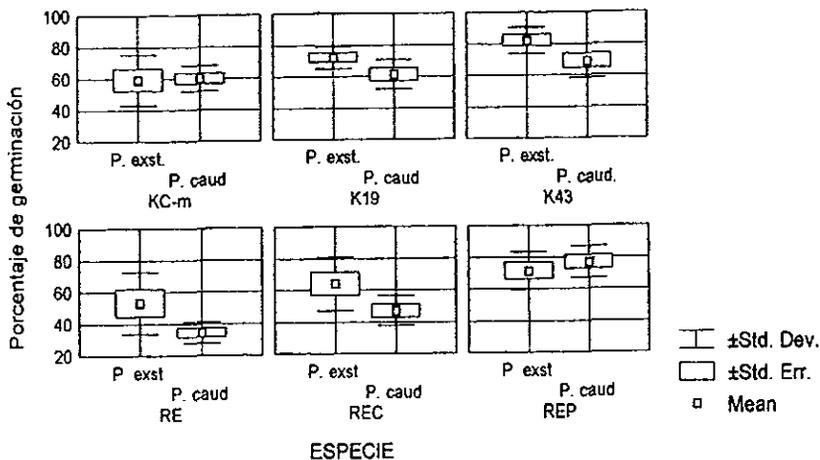
Fruto	Tratamiento	Índice germinación*	Fruto	Tratamiento	% de germinación*
2	3	14.72 <sup>a</sup>	-	3	68.99 <sup>a</sup>
1	3	13.85 <sup>ab</sup>	-	2	54.27 <sup>b</sup>
1	6	12.30 <sup>abc</sup>	-	6	50.63 <sup>b</sup>
1	2	11.07 <sup>bcd</sup>	-	5	46.09 <sup>bc</sup>
2	2	10.40 <sup>bode</sup>	-	1	45.75 <sup>bc</sup>
1	5	9.36 <sup>cde</sup>	-	4	38.18 <sup>c</sup>
1	1	8.86 <sup>cde</sup>	-		
2	1	8.01 <sup>def</sup>	-		
1	4	7.12 <sup>efg</sup>	-		
2	6	4.65 <sup>gh</sup>	-		
2	5	4.21 <sup>gh</sup>	-		
2	4	3.6 <sup>h</sup>	-		

(\*) letras diferentes implican valores significativamente diferentes entre sí. Las comparaciones se hicieron sólo entre columnas. Tratamiento: 1=KCM, 2=K19: KCM+agua coco, 3=K43: KCM+plátano y carbón activado; 4=RE; 5=REC: RE+agua de coco, 6=REP: RE+plátano y carbón activado

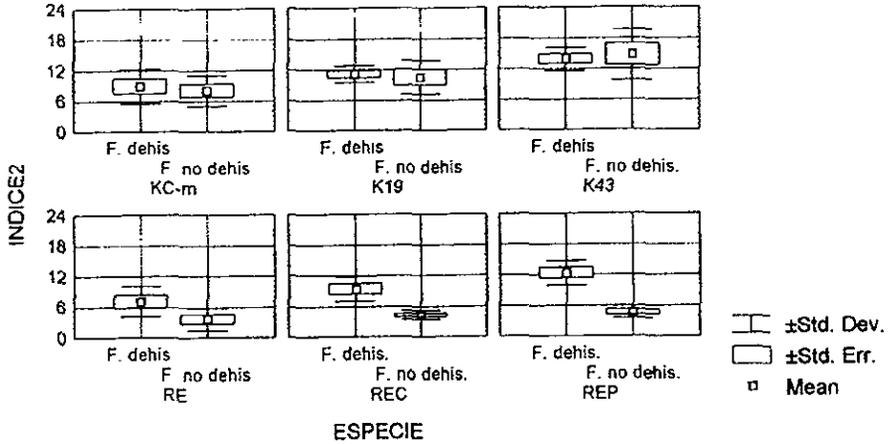
Gráfica 1. Índice de germinación de semillas maduras de *P. exstaminodium* y *P. caudatum* en los diferentes tratamientos probados



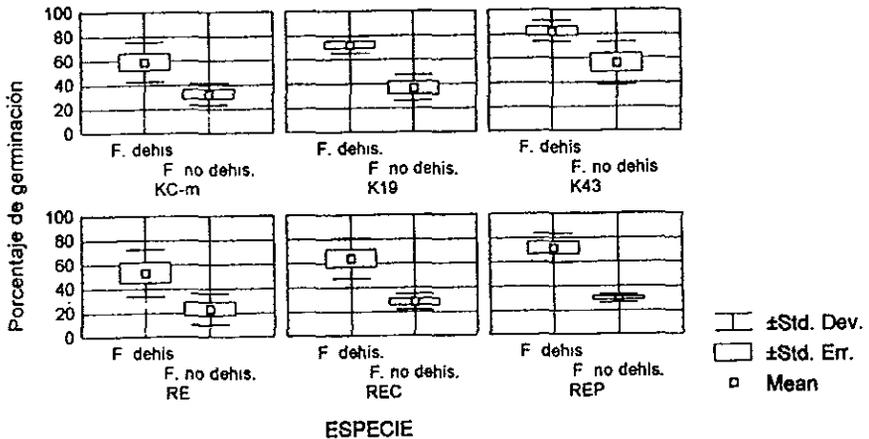
Gráfica 2. Porcentaje de germinación de semillas maduras de *P. exstaminodium* y *P. caudatum* en los diferentes tratamientos probados



Gráfica 3 Índice de germinación de semillas de *P. exstaminodium* provenientes de fruto dehisciente y no dehisciente en los diferentes tratamientos probados



Gráfica 4. Porcentaje de germinación de semillas de *P. exstaminodium* provenientes de fruto dehisciente y no dehiscente en los diferentes tratamientos probados



### III. 2. Desarrollo de plántulas de *Paphiopedilum caudatum*.

Al evaluar el desarrollo de plántulas de *P. caudatum* por medio del ANOVA factorial (Cuadro 11), se detectaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos ( $p < 0.00001$ ), pero no existió ninguna diferencia significativa en cuanto al pH; tampoco se detectó interacción entre pH y tratamientos ( $p \geq 0.05$ ). Al aplicar la prueba de LSD de Fisher para los distintos tratamientos, se observó que las mejores respuestas se obtuvieron cuando el medio KcM contenía agua de coco sin y con carbón activado (tratamientos 5 y 6 respectivamente), así como la mayor concentración de plátano (12%) más carbón activado (tratamiento 4) (Cuadro 12) Los tratamientos más deficientes fueron el KcM sin y con carbón activado pero sin extractos orgánicos (Gráfica 5).

Tomando en cuenta el tiempo, se pudo observar que las plántulas, en general presentaron un mayor crecimiento entre los 30 y 60 días, disminuyendo dicho incremento en los tiempos posteriores (Gráfica 6).

Cuadro 11. ANOVA del desarrollo de plántulas de *P. caudatum* expuestas a diferentes tratamientos

Fuente de variación	Grados de libertad	F calculada	Probabilidad <sup>a</sup>
PH	1	0.013	0.9069
Tratamientos (T)	6	9.91	0.00001*
Interacción (pH x T)	6	1.59	0.1663

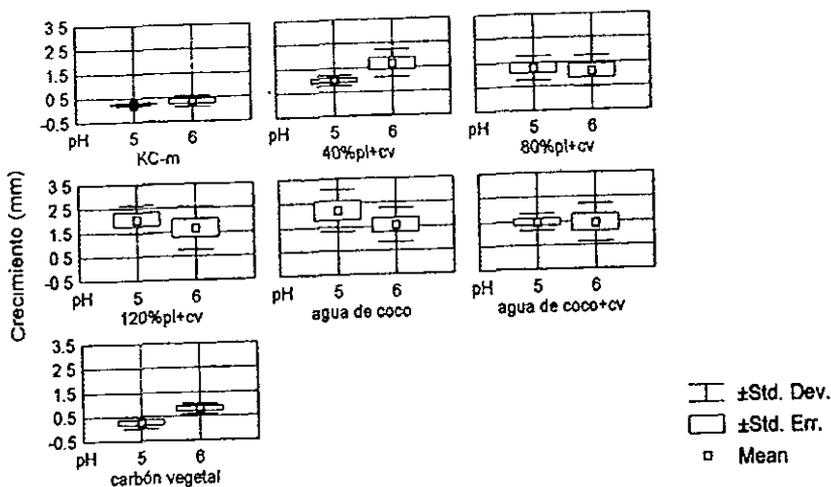
(<sup>a</sup>) con 0,05 nivel de significancia.

Cuadro 12. PRUEBA LSD DE FISHER para el desarrollo de plántulas de *P. caudatum* expuestas a diferentes tratamientos

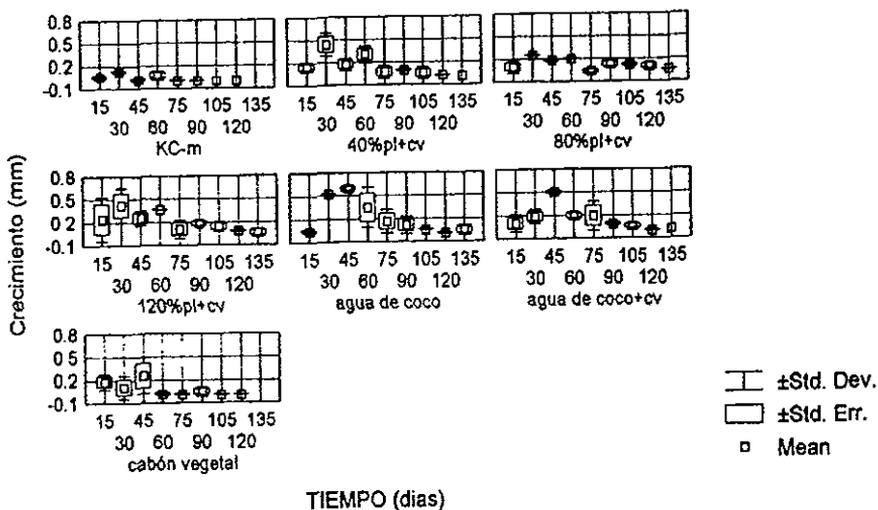
Tratamiento	Crecimiento (mm)*
5	1.86 <sup>a</sup>
4	1.84 <sup>a</sup>
6	1.43 <sup>ab</sup>
2	1.31 <sup>b</sup>
3	1.19 <sup>b</sup>
7	0.52 <sup>c</sup>
1	0.27 <sup>c</sup>

(\*) letras diferentes implican valores significativamente diferentes entre sí. Las comparaciones se hicieron sólo entre columna Tratamientos 1=KcM, 2=KcM+4 % plátano+carbón activado; 3=KcM+8% plátano+carbón activado; 4=KcM+12% plátano+carbón activado, 5=KcM+agua coco, 6=KcM+agua coco+carbón activado; 7=KcM+carbón activado

Gráfica 5. Desarrollo de plántulas de *P. caudatum* bajo distintos pH y tratamientos



Gráfica 6. Desarrollo en el tiempo de plántulas de *P. caudatum* bajo diferentes pH y tratamientos



### **III. 3. Secciones de protocormos**

En la presente investigación la respuesta en el cultivo de las secciones de protocormos fue nula. Estos explantes no tuvieron ningún tipo de crecimiento o desarrollo posterior a su cultivo en ninguno de los medios utilizados ni con ninguna de las concentraciones de hormonas probadas, algunos presentaron un cambio de coloración, tornándose de blancos a cafés después de cuatro semanas de su cultivo. En vista de estos resultados se propone utilizar protocormos sin seccionar o bien, otro tipo de explante.

### **III. 4. Establecimiento de las plántulas en invernadero.**

Las plántulas que se trasladaron a invernadero se sometieron a las mismas condiciones de temperatura, humedad, luz, etc., pero a dos tipos diferentes de sustratos (ver Materiales y Métodos). Después de un mes de su traslado, la sobrevivencia de las plántulas en las macetas (sustrato 1) fue de un 83% y en las charolas (sustrato 2) fue de un 88%. Sin embargo, a los siete meses de su traslado, todas las plántulas colocadas en macetas murieron, mientras que el 50% de las plántulas en charolas sobrevivieron. Un año después de su traslado a invernadero, la sobrevivencia de las plántulas en las charolas fue de 30%.

## IV. DISCUSION

### IV. 1. *El uso de complejos orgánicos y carbón activado en la germinación y el desarrollo de las plántulas.*

La respuesta de la germinación *in vitro* generalmente fue mayor cuando se adicionaron al medio complejos orgánicos en este caso, extractos naturales como pulpa de plátano y agua de coco, así como carbón vegetal activado. Aunque el medio RE fue el que menos favoreció la germinación de ambas especies, generalmente ésta mejoró cuando a este medio se le adicionaron extractos naturales y carbón activado. El desarrollo de las plántulas también se incrementó ante la presencia de estos complejos en el medio de cultivo. Arditti (1967a) describió los efectos que tienen los complejos orgánicos como la pulpa de plátano en la germinación de las semillas de orquídeas y en el desarrollo de las plántulas mencionando que aparentemente “son capaces de estimular la germinación y el crecimiento (...) y que su principal efecto se puede deber a la presencia de ciertos factores de crecimiento específicos”. Posteriormente el mismo autor (Arditti *et al.*, 1990) afirmó que complejos orgánicos como el agua de coco o plátano homogeneizado mejoran la germinación y el crecimiento de plántulas.

Reportes previos (Withner, 1974b) han demostrado que el plátano y el agua de coco son fuentes naturales de citocininas y que al mismo tiempo adicionan una mezcla de vitaminas y otros nutrientes como minerales y aminoácidos. También se ha reportado (Butcher y Marlow, 1989) que los componentes activos en el agua de coco y el plátano pueden ser sustancias parecidas a las auxinas y giberelinas. Withner (1974b) afirmó que el plátano puede actuar como un agente quelante natural y Arditti (1967a) señaló que el posible efecto del plátano se centra en el desarrollo y diferenciación de las plántulas. Ernst (1967, 1974, 1975, 1980) encontró que la adición de pulpa de plátano al medio de cultivo estimulaba el crecimiento de plántulas de *Phalaenopsis* y *Paphiopedilum* y éste mejoraba notablemente si se combinaba el plátano con carbón activado.

Yam y colaboradores (1990) también reportaron un excelente crecimiento en plántulas de *Paphiopedilum* al adicionar al medio de cultivo carbón activado. El crecimiento fue inferior en el mismo medio basal sin la adición del carbón. Pierik y colaboradores (1988) reportaron

que aunque la pulpa de plátano y carbón activado en plántulas de *Paphiopedilum ciliolare* inhibieron la germinación, favorecieron el posterior desarrollo de las plántulas germinadas en otros medios de cultivo.

Fay (1994) encontró que la adición de pulpa de plátano y carbón activado en el medio de cultivo incrementó el crecimiento en varias especies de orquídeas amenazadas como: *Dendrobium spectatissimum*, *Cattleya dowiana* var. *aurea*, *Clowesia rosea*, *Epidendrum ilense* y *Cymbidium rectum*.

Yam y colaboradores (1990) discutieron las propiedades absorbentes del carbón activado que lo hacen capaz de retener tanto sustancias orgánicas como inorgánicas contenidas en el medio de cultivo así como metabolitos fitotóxicos liberados por los tejidos y menciona que posiblemente los compuestos fenólicos que podrían dañar el tejido vivo se absorben, mejorando el crecimiento o recuperando plantas dañadas. También se ha reportado (Ernst, 1974) la posibilidad de que el carbón activado, debido a su estructura porosa, incremente la aereación en el medio de cultivo lo que podría aumentar el crecimiento. Sin embargo las razones de los beneficios del carbón activado continúan bajo discusión e investigación (Arditti y Krikorian, 1996).

#### **IV. 2. Respuesta por tipo de fruto.**

En cuanto a tipo de fruto el medio Knudson C adicionado con plátano 8% y carbón vegetal activado 0.2% favoreció la respuesta de germinación de semillas de *P. exstaminodium* tanto para fruto dehiscente como para fruto no dehiscente. Sin embargo, aunque ambos frutos tuvieron una respuesta satisfactoria, el fruto dehiscente respondió mejor ante un mayor número de tratamientos (Cuadro 10).

Son muchos los reportes (Saulea, 1976, Dalla Rosa y Laneri, 1977; Ballard, 1987; St-Arnaud *et al.*, 1992; Yoshikazu *et al.*, 1994) que recomiendan el uso de semillas de frutos o cápsulas verdes para su germinación *in vitro*. Así, Fast (1971) reportó que las semillas de *Paphiopedilum* provenientes de frutos no dehiscentes generalmente germinan mejor que las de frutos dehiscentes porque aparentemente, existen factores inhibitorios en las cubiertas seminales de semillas maduras de ciertas especies que están ausentes, o no son funcionales en las semillas provenientes de cápsulas verdes o no dehiscentes (Fast, 1982). Asimismo, Steele (1995) estimó que en el cultivo de semillas de frutos verdes, éstas se cosechan y cultivan antes

de recibir cualquier factor de latencia por parte de la cápsula madre. Sin embargo, se ha reportado (Haas-von Schmude *et al.*, 1986) que algunas especies de *Paphiopedilum* poseen semillas que presentan “una capa interna resistente al agua que reduce la permeabilidad” por lo que la germinación de las semillas de cápsulas dehiscentes mejora cuando estas semillas se desinfectan superficialmente. Al parecer, este tratamiento actúa químicamente aumentando la permeabilidad de la cubierta seminal (Haas-von Schmude, *op cit.*), incluso Steele (1995) consideró que esta desinfección superficial destruía compuestos inhibitorios de la germinación.

Ya que en el presente estudio se obtuvieron resultados satisfactorios con ambos tipos de frutos, se recomienda utilizar cualquiera pero con un medio de cultivo adicionado con extractos orgánicos como el agua de coco y pulpa de plátano, así como carbón activado. Sin embargo, dado que las cápsulas de la mayor parte de las especies de *Paphiopedilum* maduran y se tornan café aproximadamente al noveno o décimo mes después de la polinización, y ya que generalmente al séptimo mes (dependiendo de la especie) hay un alto porcentaje de semillas viables (Birk, 1983) se recomienda usar el fruto no dehiscente para ahorrar tiempo entre la polinización y el cultivo de las semillas, así como para facilitar dicho cultivo y disminuir su riesgo de mortalidad y contaminación que pueden provocarse como consecuencia del proceso de desinfección

#### **IV. 3. Efectos del pH en el desarrollo de las plántulas.**

No existió diferencia significativa en cuanto al desarrollo de las plántulas ante los dos valores de pH utilizados, ya que respondieron igual ante un pH de 5.0 y un pH de 6.0. Esto pareció indicar que este intervalo de una unidad en el pH no tuvo un efecto definitivo. Arditti (1967a) discutió que al parecer, las plántulas de orquídeas son poco sensibles a las diferencias del pH y que es difícil determinar si su efecto en las plántulas es directo o indirecto. Pierik y colaboradores (1988) reportaron que el desarrollo de plántulas en *Paphiopedilum ciliolare* se inhibía fuertemente con un pH de 7.0 y mejoraba notablemente cuando el pH era menor. Sin embargo tal vez sea necesario un estudio que considere un rango mayor de pH ( por ejemplo de dos unidades de diferencia: entre 5.0 y 7.0) para detectar alguna diferencia significativa en el crecimiento de las plántulas.

#### IV. 4. Secciones de protocormos.

En el presente estudio, la coloración café observada en algunos protocormos seccionados podría indicar un proceso de oxidación. Esto ha sido sugerido por Morel (1974) quien concluyó que los explantes se necrosaban debido a la oxidación de los compuestos fenólicos endógenos que se pueden manifestar cuando se realizan cortes a los tejidos. Dichos compuestos se liberan en el medio de cultivo, le dan un aspecto de decoloración e interfieren en el crecimiento de los explantes. Esto se puede disminuir y aún evitar utilizando ácido ascórbico; la adición de un poco de carbón al agar previene el teñimiento fenólico así como la acción negativa de los compuestos fenólicos en el cultivo (Warren, 1983).

Asimismo, la presencia en los medios de cultivo de la citocinina BA pudo haber causado el cambio de coloración en los explantes utilizados, ya que se ha reportado (Reinert y Mohr, 1967) que esta citocinina favoreció el crecimiento de callo en explantes de *Cattleya*, pero si ésta se adicionaba al medio desde el inicio, los explantes no crecían y se tornaban cafés. Asimismo, Intuwong y Sagawa (1974, citados por Stewart y Button, 1975) reportaron algo semejante en el cultivo de tejidos de *Phalaenopsis* cuando se incluía al medio agua de coco, sustancia compleja que se sabe que contiene citocininas y otros reguladores de crecimiento.

Ya que bajo las condiciones de cultivo ensayadas en el presente estudio, la micropropagación de ambas especies mediante protocormos seccionados no fue exitosa, se propone utilizar protocormos sin seccionar. Pierik y Steegmans (citados por Stewart, 1989) observaron la formación de callo y regeneración de plántulas a partir de material joven como los protocormos. Asimismo, se ha reportado (Wimber, 1963, 1965 citado por Stewart, 1989) que el cultivo de meristemas en medio líquido y en constante agitación aumenta considerablemente el número de cuerpos parecidos a protocormos ó PLBs (protocorm like bodies). Sin embargo, Stewart y Button (1975) discutieron que el crecimiento de las plantas de *Paphiopedilum* es simpodial y los nuevos brotes surgen de una o más yemas axilares cerca de la base del tallo, por lo que, para utilizar el meristemo apical es necesario destruir un brote en desarrollo. Esto significa un alto riesgo para estas especies en extinción, por lo que el desarrollar un método de propagación clonal que no requiera del sacrificio de un brote representaría una buena alternativa. Por lo anterior, sería conveniente probar otros tipos de explantes utilizando las plántulas propagadas *in vitro* (por ejemplo ápices de hoja, raíz y tallos) y otras combinaciones y/o concentraciones de hormonas. Morel (1974) reportó que algunos

ápices de tallo de *Paphiopedilum* crecieron y casi inmediatamente se diferenciaron en plántulas, reportando la primera propagación exitosa de cultivo de tejidos en este género. Este autor obtuvo PLBs a partir de callo al colocar los ápices de tallo en medio de cultivo Thomale (1954) adicionado con ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), y más tarde la formación de plántulas en el mismo medio pero en ausencia de dicha auxina. Stewart y Button (1975) utilizaron varios tipos de explantes para la propagación de *Paphiopedilum*, entre ellos: ápices de tallo, inflorescencias de diferentes edades, ápices de hojas, ápices de raíces, secciones de ovario y estambres en medio de cultivo tanto sólido como líquido adicionados con diferentes concentraciones y combinaciones de hormonas. Sin embargo la contaminación fue un factor limitante y pocos cultivos se lograron. El único explante que llegó a formar callo y casi inmediatamente protocormos, los cuales después originaron plántulas, fue el ápice de tallo en medio Heller (1965) sólido y adicionado con 2,4-D y BA.

Es necesaria más investigación acerca de los requerimientos para el cultivo *in vitro* del género *Paphiopedilum*, que permitan conocer el ó los medios de cultivo, así como la combinación y concentración de hormonas más efectivos para efectuar una propagación masiva por medio de cultivo de tejidos.

Los clones deseables en este género son muy caros, lo que convierte a la micropropagación en una opción muy redituable (Arditti y Ernst, 1993). Sin embargo, hasta el momento, géneros comercialmente importantes como *Paphiopedilum* no poseen un método comercial eficiente de propagación clonal (Mastura y Arditti, 1985). El desarrollo de un método de propagación clonal rápida que no requiera del sacrificio de una gran porción de la planta madre o de un brote completo representaría un gran avance para la propagación masiva de especies de este género. Al haber suficientes plantas de probadas cualidades hortícolas, artificialmente propagadas, que satisfagan la demanda del mercado, existirían pocas razones para buscar plantas silvestres, lo que a su vez, reduciría la presión de colecta sobre poblaciones naturales. De esta manera, la comercialización de clones de especies ornamentales amenazadas puede reducir el riesgo de extinción (Soto, 1996). Esto aunado a la existencia de acuerdos internacionales (Anónimo, 1994) que incentivan este tipo de producción no destructiva, se podría garantizar cabalmente la supervivencia y recuperación de dichas especies.

#### IV. 5. *Establecimiento en invernadero.*

Cuando las plántulas se sacan de los frascos de cultivo para adaptarlas a condiciones de invernadero, termina su desarrollo bajo condiciones estériles. Dichas plántulas, entonces, necesitan establecerse en macetas y/o charolas comunitarias con un sustrato en el que puedan terminar de desarrollar sus sistemas radicular y vegetativo, y eventualmente, después de transferirlas individualmente a macetas más grandes lleguen a ser plantas con flores, completamente establecidas (Thompson, 1977).

Después de transferirlas de los frascos de cultivo a condiciones de invernadero, las plántulas de *Paphiopedilum extaminodium* y *P. caudatum*, al igual que muchas plántulas propagadas *in vitro* son muy vulnerables, por lo que se debe tener cuidado principalmente con los siguientes aspectos: la temperatura, la humedad atmosférica, la luz, el riego, la elección del sustrato y la circulación del aire. Todo esto con base en las características físicas y fisiológicas de las especies.

A pesar de que las especies de *Paphiopedilum* son orquídeas con crecimiento simpodial, no poseen pseudobulbos (órganos especializados en almacenar nutrientes y agua) por lo que deben tener un abasto constante y regular de agua. Por lo anterior, al traspasar las plántulas *in vitro* a invernadero, se consideraron dos sustratos que permitieran un buen drenaje pero que al mismo tiempo mantuvieran una humedad constante. Sin embargo, a pesar de que la mezcla de *Sphagnum*/perlita/carbón se ha recomendado para el cultivo de plántulas de *Paphiopedilum* (Gilraine, 1996), y *Phragmipedium* (Kehew, 1991; Baker y Baker, 1991) después de un tiempo, el sustrato constituido por esta mezcla aparentemente no mantuvo la humedad suficiente, lo que provocó la rápida desecación de las plántulas. Por tanto, al traspasar plántulas *in vitro* a condiciones de invernadero, es importante considerar: a) un sustrato que permita una humedad constante pero moderada, b) evitar la desecación o exceso de riego, c) mantener una adecuada temperatura, luz y humedad atmosférica d) evitar la incidencia directa de luz y e) mantener una ventilación constante (Corkhill, 1996; Evans, 1996).

## V. CONCLUSIONES

- La respuesta de germinación de *P. exstaminodium* y *P. caudatum* en ausencia de compuestos orgánicos y de carbón activado fue mayor en el Knudson C modificado que en el medio RE.
- El uso de complejos orgánicos y carbón activado, mejoró significativamente la germinación y el desarrollo de plántulas en ambas especies.
- En general, la germinación de semillas de *P. exstaminodium* provenientes de fruto dehiscente fue mayor que cuando se utilizaron frutos verdes. Sin embargo, una de las mejores respuestas se obtuvo cuando las semillas inmaduras del fruto no dehiscente se colocaron en el medio KCm adicionado con pulpa de plátano y carbón vegetal activado. El uso de agua de coco también incrementó la germinación en semillas de ambos frutos.
- Ya que en el presente estudio se obtuvieron resultados satisfactorios con ambos tipos de frutos, se recomienda utilizar cualquiera pero con un medio de cultivo adicionado con extractos orgánicos y carbón activado.
- El desarrollo de las plántulas se incrementó cuando al medio KCm se le adicionaron agua de coco y una concentración alta (12%) de extracto de plátano más carbón activado.
- Son necesarios más estudios comparativos sobre el o los efectos del pH en plántulas en desarrollo ya que los efectos generales del pH tanto en la germinación como en el desarrollo de orquídeas no se conocen bien y existen pocos estudios relacionados

- La propagación *in vitro* mediante protocormos seccionados no fue exitosa, por lo que se propone intentarla con protocormos sin seccionar, con otro tipo de explante y/o con otro(s) medio(s) de cultivo. Esto constituye un paso a seguir para complementar el conocimiento generado en la presente investigación
- A pesar de la problemática que presentan las especies estudiadas en condiciones naturales y como parte de un grupo que ha demostrado ser difícil de propagar artificialmente, se logró la germinación asimbiótica de semillas de *Paphiopedilum exstaminodium* y *P. caudatum* incrementándose el material para investigación, intercambio, reserva y micropropagación, lo que representa un primer paso en la lucha por la conservación de estas especies.
- Los resultados aquí obtenidos sirven de base para orientar sobre posibles metodologías relacionadas con la germinación *in vitro* de otras especies del género *Paphiopedilum* así como de géneros cercanos filogenéticamente. Especies como estas podrían perderse para las futuras generaciones si no se toman las medidas necesarias para su propagación, conservación y recuperación.

## VI. REFERENCIAS

- Albert, V.A. 1994. Cladistic relationships of the slipper orchids (Cypripedioideae, Orchidaceae). *Lindleyana* 9(2): 115-132.
- Albert, V.A. y B. Pettersson. 1994. Expansion of genus *Paphiopedilum* Pfitzer to include all conduplicate-leaved slipper orchids (Cypripedioideae). *Lindleyana* 9(2): 133-139.
- Anónimo. 1994. CITES News Plants. A newsletter for the European region of the CITES plants committee. Issue I.
- Arditti, J. 1967a. Factors affecting the germination of orchid seeds. *Botanical Rev.* 33: 1-97.
- Arditti, J. 1967b. Niacin biosynthesis in germinating x *Laeliocattleya* orchid embryos and young seedlings. *American Journal of Botany* 54(3): 291-291.
- Arditti, J., E. A. Ball y M. Churchill. 1972. Propagación clonal de orquídeas utilizando ápices de hojas. *Orquídea (México)* II (10): 290-300.
- Arditti, J. 1977. Clonal propagation of orchids by means of tissue culture -A manual- En: J. Arditti (ed.). *Orchid Biology. Reviews and Perspectives I.* Cornell Univ. Press, Ithaca, New York, 203-293.
- Arditti, J. y C. Harrison. 1977. Vitamin requirements and metabolism in orchids. En: J. Arditti (ed.). *Orchid Biology. Reviews and Perspectives I.* Cornell Univ. Press, Ithaca, New York, 157-175.
- Arditti, J. 1979. Aspects of orchid physiology. *Advances Bot. Res.* 7: 421-655. Academic Press, London.
- Arditti, J. 1982. Orchid seed germination and seedling culture -A manual- En: J. Arditti (ed.). *Orchid Biology. Reviews and Perspectives II.* Cornell Univ. Press, Ithaca, New York, 243-370.
- Arditti, J. 1984. An history of orchid hybridization, seed germination and tissue culture. *Botanical Journal of the Linnean Society* 89: 359-381.
- Arditti, J. y R. Ernst. 1984. Physiology of germinating orchid seeds. En: J. Arditti (ed.). *Orchid Biology. Reviews and Perspectives III.* Cornell Univ. Press, Ithaca, N. Y. 177-222.
- Arditti, J., R. Ernst, T.W. Yam and C. Glabe. 1990. The contributions of orchid mycorrhizal fungi to seed germination: a speculative review. *Lindleyana* 5(4): 249-255.

- Arditti, J. 1992. *Fundamentals of Orchid Biology*. New York: Wiley-Interscience.
- Arditti, J. y R. Ernst 1993. *Micropropagation of Orchids*. J. Wiley & Sons, N. Y. 682 pp.
- Arditti, J. y A. Krikorian. 1996. Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators. *Botanical Journal of the Linnean Society* 122: 183-241.
- Baker, L. y O. Baker. 1991. *Orchid Species Culture*. Cap. 6. Timber Press, Oregon.
- Batchelor, S. 1994. Your first orchid. *American Orchid Society Bulletin*, 38-44.
- Bechtel, H., Ph. Cribb, E. Launert. 1992. *The Manual of Cultivated Orchid Species*. Third Edition. The MIT Press. Cambridge, Massachusetts.
- Bertsch, W. 1967. A new frontier: orchid propagation by meristem tissue culture. *American Orchid Society Bulletin* 36: 32-38.
- Bramwell, D. 1990. The role of *in vitro* cultivation in the conservation of endangered species. *Proceedings of the International Conference on: Conservation Techniques in Botanic Gardens*. Córdoba, España.
- Birk, L. 1983. *The Paphiopedilum Grower's Manual*. Pisang Press. 208 pp.
- Burgeff, H. 1936. *Samenkeimung der Orchideen und Entwicklung ihrer Keimpflanzen*, p. 200 G. Fischer Verlag, Jena.
- Butcher, D. 1959. Mycorrhiza of orchids. En: C. L. Withner (ed.). *The Orchids. A Scientific Survey*. The Ronald Press Company, 648.
- Butcher, D. y S. A. Marlow. 1989. Asymbiotic germination of epiphytic and terrestrial orchids. En: H. W. Pritchard (ed.). *Modern Methods in Orchid Conservation. The role of Physiology*. Cambridge Univ. Press, 31-38.
- Campbell, F.T. y N. Marshall. 1990. The world moves to tame the wild-plant trade. *Garden (marzo-abril)*: 6-11.
- Capellades, Q.M., M. Beruto, A. Vanderschaeghe y P. C. Debergh. 1991. En: P. C. Debergh y R.H. Zimmerman (eds.). *Micropropagation*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 215-229.
- Cash, C. 1991. *The Slipper Orchids*. Timber Press. Portland, Oregon.
- Castaño, G., E. Hagsater y E. Aguirre. 1984. *Phragmipedium exstaminodium*: una nueva especie de Chiapas, México. *Orquídea* 9(2): 191-197.

- Corkhill, P. 1996. Raising *Cypripedium calceolus* from flask. *Orchid Review* 104(1212): 348-352
- Christenson, E. y T. Henkel. 1995. *Phragmipedium klotzcheanum*. *American Orchid Society Bulletin* 64(10): 1100-1101.
- Dalla Rosa, M. and U.Laneri. 1977. Modification of nutrient solution for germination and growth *in vitro* of some cultivated orchids and for the vegetative propagation of *Cymbidium* cultivars. *American Orchid Society Bulletin* 46(9): 813-820.
- Debergh, P., J. De Riek y D. Matthys. 1994. Nutrient supply and growth of plants in culture. En: P. J. Lumsden, J. R. Nicolas y W. J. Daviers (eds.). *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 58-68.
- Dumont, V., E. Hágsater, Ph. Cribb y A. Pridgeon. 1996. En: Hágsater, E. y V. Dumont (eds) *Orchids. Status Survey and Conservation Action Plan*. IUCN/SSC Orchid Specialist Group, 131-134
- Ernst, R. 1967. Effect of carbohydrate selection on the growth rate of freshly germinated *Phalaenopsis* and *Dendrobium* seed. *American Orchid Society Bulletin* 36: 1068-1073.
- Ernst, R. 1974. The use of activated charcoal in asymbiotic seedling culture of *Paphiopedilum*. *American Orchid Society Bulletin* 43(1): 35-38.
- Ernst, R. 1975. Studies in asymbiotic culture of orchids. *American Orchid Society Bulletin* 44(1): 12-18
- Ernst, R. 1980. Seed germination of *Paphiopedilums*. *The Orchid Review* 88. 235-236.
- Ernst, R. y E. Rodríguez. 1984. Carbohydrates of Orchidaceae. En: J. Arditti (ed). *Orchid Biology, Reviews and Perspectives III*. Cornell Univ. Press, Ithaca, London, 223-260.
- Evans, L. 1996. From flask to compot. *Orchids* 8: 834-835.
- Fast, G. 1971. Versuche zur Anzucht von *Paphiopedilum* aus Samen. *Die Orchidee* 20(5): 189-192
- Fast, G. 1982. European terrestrial orchids (symbiotic and asymbiotic methods). En: J. Arditti (ed.) *Orchid Biology. Reviews and Perspectives II*. Cornell Univ. Press, Ithaca, N.Y. 309-326.
- Fay, M.F. 1994. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation?. *Biodiversity and Conservation* 3, 176-183.

- Flameé, M. 1978. Influence of selected media and supplements on the germination and growth of *Paphiopedilum* seedlings. *American Orchid Society Bulletin* 47(5). 419-423.
- Gilrairie, P. 1996. Growing *Paphiopedilums*. *Orchid Review* 104(1208). 85-91.
- Goh, C. J. 1990. Orchids, monopodials. En: Ammirato, P. V., D. R. Evans, W. R. Sharp y Y.P.S. Bajaj (eds.). *Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 5. Ornamental Species*. McGraw-Hill Publishing Company, New York, 598-637.
- Haas-von Schmude, N. F., E. Lucke, R. Ernst y J. Arditti. 1986. *Paphiopedilum rothschildianum*. *American Orchid Society Bulletin* 55(4): 579-584.
- Harrison, C.R. y J. Arditti. 1972. Cultivo de la orquídea por semilla. *Orquidea* II(4):81-90.
- Hawkes, A. D. 1965. *Encyclopaedia of cultivated Orchids*. Faber & Faber Limited.
- Heller, R. 1953. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro. *Ann. Sc. Nat. Bot. Biol. Vég.* 14: 1-223.
- Heller, R. 1965. Some aspects of the inorganic nutrition of plant tissue cultures. En: *Proc. Intern. Conf. Plant Tissue Culture*. P.R. White & A.R. Grove (eds.), Berkeley.
- Hennessy, E. F. y T. A. Hedge. 1989. *The Slipper Orchids. Selenipedium, Phragmipedium, Criosanthes, Cypripedium y Paphiopedilum*. ACORN BOOKS.
- Knees, S. G. 1989. Import and export of orchids and the law. En: H. W. Pritchard (ed.). *Modern Methods in Orchid Conservation: The Role of Physiology, Ecology and Management*. Cambridge University Press, New York, 163-169.
- Kehew, K. 1991. *Phragmipedium* culture guide. *American Orchid Society Bulletin* 60(6): 543-547.
- Knudson, L. 1921. La germinación no simbiótica de las semillas de orquídeas. *Bulletin de la Real Societa Espanola de Historia Natural*. 21: 250-260.
- Knudson, L. 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette* 73: 1-25.
- Knudson, L. 1925. Physiological study of the symbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette* 79: 345-379.
- Knudson, L. 1934. Storage and viability of orchid seed. *American Orchid Soc. Bulletin* 2:66
- Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin* 15: 214-217.

- Martínez, P.A. 1985. Inducción *in vitro* de brotación múltiple en *Bletia urbana* Dressler (Orchidaceae) a partir de protocormos seccionados Tesis Profesional. Fac. de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mastura y J. Arditti. 1985. Mericloning. the 25<sup>th</sup> anniversary. The Orchid Review 93(1106): 410-418.
- McCook, L.M 1990. The genus *Phragmipedium*-Part II. American Orchid Society Bulletin 59(2): 153-158.
- Morel, G. 1960. Producing virus-free cymbidiums. American Orchid Society Bulletin 29: 495-497.
- Morel, G. 1964. Tissue culture: A new means of clonal propagation of orchids. American Orchid Society Bulletin 33: 473-478.
- Morel, G. 1965. Clonal propagation of orchids by meristem culture. Cymbidium Society News 20(7): 3-11.
- Morel, G. 1971. The principles of clonal propagation of orchids. Proceedings of the 6th World Orchid Conference, Sydney.
- Morel, G. 1974. Clonal multiplication of Orchids. En: C. L. Withner (ed.). The orchids: scientific studies. J. Wiley & Sons, New York, 169-222.
- Mosich, S., E. Ball y J. Arditti. 1973. Propagación clonal de *Dendrobium* por medio de cultivo de nodos. Orquidea (México) 3(8): 244-255.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum 15: 473-497.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Annual Reviews of Plant Physiology 25: 135-166.
- Murashige, T. 1990. Plant propagation by tissue culture: a practice with unrealized potential. En: Ammirato, P. V., D. R. Evans, W. R. Sharp y Y. P. S. Bajaj (eds.). Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 5. Ornamental Species. McGraw-Hill Publishing Company, New York, 3-9.
- Ospina, M. 1996. Orchidology and Biotechnology. Orchids. October: 1072-1074.
- Pierik, R., P. A. Sprenkels, B. Van Der Harst y Q. G. Van Der Meys. 1988. Seed germination and further development of plantlets of *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz. *in vitro*. Scientia Horticulturae 34: 139-153

- Pridgeon A. 1996. Executive Summary En: Hágsater, E. y V. Dumont (eds.). Orchids. Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN/SSC Orchid Specialist Group, viii.
- Pritchard, H. W. y P. T. Seaton. 1993. Orchid seed storage: historical perspective, current status, and future prospects for long-term conservation. *Selbyana* 14: 89-104.
- Reinert, A. y H. C. Mohr. 1967. Propagation of *Cattleya* by tissue culture of lateral bud meristem. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 91: 664-671.
- Rodan, B. D. y F. T. Campbell. 1996. CITES and the sustainable management of *Swietenia macrophylla* King. *Botanical Journal of the Linnean Society* 122: 83-87.
- Rhodehamel, W.A. 1994. Pollination of Orchid flowers. *American Orchid Society Bulletin* 63(5): 534-541.
- Rubluo, A., V. Chávez y A. Martínez. 1989. *In vitro* seed germination and re-introduction of *Bletia urbana* (Orchidaceae) in its natural habitat. *Lindleyana* 4(2): 68-73.
- Rubluo, A., V. Chávez, A. Martínez y O. Martínez V. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through in vitro culture. *Biological Conservation* 63: 163-169.
- Sagawa, Y. 1990. Orchids, other considerations. En: Ammirato, P. V., D. R. Evans, W. R. Sharp y P. S. Bajaj (eds.). *Handbook of Plant Cell Culture Vol. 5. Ornamental Species*. McGraw-Hill Publishing Company, New York, 638-653.
- Sagawa, Y. y J. T. Kunisaki. 1982. Clonal propagation of orchids by tissue culture. En: *Proc. 5th Cong. Plant Tissue and Cell Culture*, 683-684.
- Sagawa, Y. y J. T. Kunisaki. 1984. Clonal Propagation: Orchids. En: I. K. Vasil (ed.). *Cell Culture Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. I*. Academic Press Inc., Orlando, 61-67.
- Salazar, G. A. 1996. Conservation Threats. En: Hágsater, E. y V. Dumont (eds.). Orchids. Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN/SSC Orchid Specialist Group, 6-10.
- Sauleda, R. 1976. Harvesting times of orchid seed capsules for the green pod culture process. *American Orchid Society Bulletin* 45(4): 305-309.
- SEDESOL. 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-1994. *Diario Oficial de la Federación*. CDLXXXVIII. No. 10 (16 de Mayo, 1994).
- Soto Arenas, M. 1994. Population Studies in Mexican Orchids. En: A. Pridgeon (ed.). *Proceedings of the 14th World Orchid Conference*. HMSO, Edinburg, 153-160.

- Soto Arenas, M. 1996. Regional Accounts: Proposed urgent actions En: Orchids. Status Survey and Conservation Action Plan. Hágsater, E. y V. Dumont (eds.), IUCN/SSC Orchid Specialist Group, 57-58.
- St- Arnaud, M., D. Lauzer y D. Barabé. 1992. *In vitro* germination and early growth of seedlings of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). *Lindleyana* 7(1): 22-27.
- Steele, W. K. 1995. Growing *Cypripedium reginae* from seed. *American Orchid Society Bulletin* 64(4): 382-391.
- Stewart, J. y J. Button. 1975. Tissue culture studies in *Paphiopedilum*. *American Orchid Society Bulletin* 44(7): 591-599.
- Stewart, J. y J. Button. 1976. Tissue culture studies in *Paphiopedilum*. En: *Proceedings of the 8th World Orchid Conference*. Karlheinz Senghas (ed.), Palmengarten, Frankfurt. 372-378.
- Stewart, J. 1988. *Orchids*. Kew Gardening Guides. Timber Press, Oregon, 124 pp.
- Stewart, J. 1989. Orchid propagation by tissue culture techniques - past, present and future. En: H. W. Pritchard (ed.). *Modern Methods in Orchid Conservation*. Cambridge Univ. Press. 87-100.
- Stimart, D.P. y P.D. Ascher. 1981. *In vitro* germination of *Paphiopedilum* seed on a completely defined medium. *Scientia Horticulturae* 14: 165-170.
- Thomale, H. 1954. *Die Orchideen*. Eugen Ulmer Verlag. Stuttgart.
- Thompson, P.A. 1973. *J. Roy. Hort. Soc.* 98.
- Thompson, P.A. 1977. *Orchids from seed*. Royal Botanic Gardens Kew.
- Vacin, E. y F. Went. 1949. *Botanical Gazette* 110: 605-613.
- Vellupillai, M., S. Swarup y C. J. Goh. 1997. *Histological and protein changes during early stages of seed germination in the orchid, Dendrobium crumenatum*. *Journal of Horticultural Science* 72(6): 941-948.
- von Arx, B. 1996. *Conservation Strategy*. En: Hágsater, E. y V. Dumont (eds.). *Orchids. Status Survey and Conservation Action Plan*. IUCN/SSC Orchid Specialist Group. 11-14
- Waes, J. Van and P. Debergh. 1986. *In vitro* germination of some European orchids. *Physiologia Plantarum* 67: 253-261.
- Wang, X. 1988. Tissue culture of *Cymbidium*: Plant and flower induction *in vitro*. *Lindleyana* 3: 184-189.

- Warren, R. 1983. Tissue culture. *Orchid Review* 91(1080): 306-308.
- Withner, C.L. 1959a. *Orchid Physiology*. En. C.L. Withner (ed). *The Orchids. Scientific Survey*. J. Wiley & Sons. New York-London-Sidney-Toronto, 315-360.
- Withner, C.L. (ed). 1959b. *The Orchids. Scientific Survey*. J. Wiley & Sons. New York-London-Sidney-Toronto.
- Withner, C.L. 1974a *The Orchids. Scientific Studies*. J. Wiley & Sons. New York-London-Sidney-Toronto.
- Withner, C.L. 1974b. *Developments in Orchid Physiology*. En. C.L. Withner (ed). *The Orchids Scientific Studies*. J. Wiley & Sons. New York-London-Sidney-Toronto, 129-168.
- Yam, T. W., R. Ernst, J. Arditti, H. Nair y M. Weatherhead. 1990. Charcoal in orchid seed germination and tissue culture media: a review. *Lindleyana* 5(4): 256-265.0
- Yamada, M. 1952. Progress report on germination work. *Hawaii Orchid Society Bulletin* 4:24-26.
- Yoshikazu, H., K. Kondo y S. Hamatani. 1994. *In vitro* seed germination of four asiatic taxa of *Cypripedium* and notes of the nodal micropropagation on american *Cypripedium montanum*. *Lindleyana* 9(2) 93-97.

APENDICE 1. MEDIO DE CULTIVO KNUDSON "C" MODIFICADO (KcM) (Dalla Rosa y Laneri, 1977).

COMPONENTE	mg/l	SOL. CONCENTRADA 10x
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1000	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	250	mg 2500
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	250	mg 2500
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	250	mg 2500
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	7.5	mg 75
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8	
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3	

Micronutrientes Heller (1953) sin hierro agregar 1 ml/l; agar bacteriológico 8 g/l; sacarosa 20 g/l; pH = 5.0 ± 0.2 (Ernst, 1980).

APENDICE 2. MEDIO DE CULTIVO RE (Ernst, 1980), modificado con 10 g/l de agar.

COMPONENTE	mg/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	150
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400
KNO <sub>3</sub>	400
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	300
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	100
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	150
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	25

Agar bacteriológico 10 g/l; fructosa 20 g/l, pH = 5.2 ± 0.2

APENDICE 1 MEDIO DE CULTIVO KNUDSON "C" MODIFICADO (Kcm) (Dalla Rosa y Laneri, 1977).

COMPONENTE	mg/l	SOL. CONCENTRADA 10x
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1000	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	250	mg 2500
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	250	mg 2500
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	250	mg 2500
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	7.5	mg 75
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8	
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3	

Micronutrientes Heller (1953) sin hierro agregar 1 ml/l; agar bacteriológico 8 g/l; sacarosa 20 g/l; pH = 5.0 ± 0.2 (Ernst, 1980).

APENDICE 2. MEDIO DE CULTIVO RE (Ernst, 1980), modificado con 10 g/l de agar.

COMPONENTE	mg/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	150
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400
KNO <sub>3</sub>	400
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	300
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	100
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	150
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	25

Agar bacteriológico 10 g/l; fructosa 20 g/l; pH = 5.2 ± 0.2

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

COMPONENTE	mg/l
MACRONUTRIMENTOS:	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650.00
KNO <sub>3</sub>	1900.00
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.00
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440.00
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.80
Na <sub>2</sub> EDTA	37.30
MICRONUTRIMENTOS:	
KI	0.83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.30
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.60
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.25
VITAMINAS:	
Ac. nicotínico	0.50
Piridoxina-HCl	0.50
Tiamina-HCl	0.10
GLICINA	2.00
INOSITOL	100.00

Agar bacteriológico 8 g/l; sacarosa 30 g/l; pH = 5.7

## ANEXO 1.

### *Paphiopedilum exstaminodum.*

DESCRIPCION BOTANICA (Castaño *et al.*, 1984): Hierba epífita, hasta 50 cm de alto. Raíces sencillas, rizoma corto, tallos formando un abanico de hojas imbricadas, éstas sub-lineares hasta 45 cm de largo, 4 cm de ancho, las basales más largas y progresivamente más cortas. Inflorescencia apical, del centro del abanico foliar, hasta 50 cm de alto incluyendo las flores. Escapo de sección elíptica, pubescente, de unos 6 mm de diámetro en la sección basal. Flores generalmente dos, muy vistosas y duraderas. Brácteas en la base de cada ovario pedicelado y una apical, subfoliáceas, progresivamente menores, la basal 7.5 cm de largo, 3.6 cm de ancho extendida, conduplicada, la superficie interior escabrosa-hirsuta, los pelillos formados por una célula terminada en otra elipsoidal de color rojo-ambar. Ovario pedicelado de 12 cm de largo aproximadamente, abruptamente doblado en el ápice. Sinsépalo ovado-agudo, de 9 cm de largo, 3.5 cm de ancho cerca de la base, 17 nervado, de color blanco o crema con nervaduras de color café, verdosas ventralmente hacia la base, superficie exterior puberulenta, interior glabra. Sépalo dorsal cerca de la base, 11 nervado, demás detalles semejantes al sinsépalo. Pétalos alargado-colgantes, retorcidos, muy angostamente ovalados y largamente acuminados; de 24-45 cm de largo; glabros exteriormente, finamente pubescentes interiormente, el margen basal ciliado, los cilios pluricelulares, morados; la superficie exterior escasamente cubierta por cilios cortos y la interior densamente cubierta; con 9 nervaduras, sulcados en la superficie exterior; de color blanco con nervios verdosos en la base tornandose rojo-morados hacia el ápice de color guinda sólido, especialmente por el anverso. Labelo formando una bolsa, glabro por fuera pubescente por dentro, los márgenes involutos, de 5 cm de largo, de color blanco con guinda al frente y ciliado amarillo-pardo en la boca, blanco por dentro con puntos guindas. Androceo sin escudo, bifurcado, anteras dos. Polinios 4, dos en cada antera, semicirculares, granulosos, aplanados. Gineceo obovoideo, pubérulo. Cápsula alargada de color café, pubescente, 11.5 cm de largo y 5 mm de diámetro en su parte más ancha. Semillas de color café oscuro.

## ANEXO 2.

### *Paphiopedilum caudatum.*

DESCRIPCION BOTANICA (Hawkes, 1965; Bechtel, 1992; Baker y Baker, 1991; Cash, 1991): Hierba epífita o litófito. Raíces sencillas; tallos pequeños formando un abanico de generalmente 5 hojas que nacen muy próximas entre sí, lineares-lanceoladas, de entre 60 y 90 cm de largo, semierectas y coriáceas. Inflorescencia apical, glabra, erecta, hasta de 1 m de altura; las espigas emergen del centro de los abanicos de hojas; los pedicelos de las flores individuales con más de 15 cm de longitud. Flores de 2-4 por escapo, duraderas, de las más grandes del género. Ovario pedicelado. Sépalo dorsal de color amarillo pálido o blanquecino con nervadura reticular al frente que varía de marrón a verde claro; lanceolado y agudo; colgante, de 20 cm de longitud por 2.5-3 cm de ancho; pubescente en su parte posterior. Pétalos alargado-acuminados, parecidos a listones, de hasta 80 cm de largo por 2.5 cm de ancho en su parte proximal, con márgenes ondulados y con largos pelillos multicelulares; en su parte distal con pocos mm de ancho; de color magenta o rojo oscuro y con nervadura rojiza. Labelo formando una bolsa, pubescente por dentro, márgenes involutos, abertura subtriangular, de aprox 6 cm de largo; el saco de color blanquecino es verde en su base y café oscuro rojizo en su parte superior. Androceo con estaminodio triangular y amarillento, 2 anteras fértiles, con 4 polinios cada una. Cápsula alargada, verde, pubescente, hasta 13 cm de largo y 5 mm de diámetro. Semillas color café.