



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

PROLIFERACION DE *Rhynchostele bictoniense*
(ORCHIDACEAE) A PARTIR DE EXPLANTES DE
MATERIAL CULTIVADO *IN VITRO*

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
ADRIANA MONTSERRAT ESPINOSA GONZALEZ

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. ERNESTO AGUIRRE LEON



TLALNEPANTLA EDO. DE MEXICO,

OCTUBRE DEL 2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

Agradecimientos:

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala por permitirme realizar mis estudios.

Al M. en C. Ernesto Aguirre León, por su apoyo y enseñanzas durante tanto tiempo y por haber depositado su confianza en mí.

A la Biol. Ma. Elena Huidobro Salas, por el apoyo que siempre me brindó en la realización de esta tesis.

Al M. en C. César Mateo Flores, por su ayuda y comentarios en la realización de este trabajo.

A la Biol. Margarita Moreno Ramírez, por su invaluable ayuda y comprensión durante todo el trabajo.

A la Biol. Josefina Vázquez Medrano, por sus observaciones en la realización de este documento.

A Celia y Carmen secretarias de la jefatura de Biología por todas sus atenciones.

A los Biol. Peter Mueller y Biol. Virginia Nava por su confianza y ayuda en todo momento.

Dedicatorias:

A mis padres, por su apoyo en este primer paso de mi vida profesional.

A mis hermanas Maricela y Viridiana: como un precedente para continuar.

A mi Tía Margarita, por que siempre has estado cerca de mí y por que has sido mi otra mamá.

A Juana Elvia Gutiérrez, gracias por sentirte orgullosa de mí.

A ti mamá muy en especial por todo tu amor, confianza y comprensión.

A mi profe Ernesto Aguirre, por su incondicional apoyo, aliento, enseñanza y paciencia en todo momento desde el primer día, y sobre todo por su amistad.

A mis amigos que me impulsaron, apoyaron, y que estuvieron conmigo en todo momento. En especial a aquellos con los que he compartido momentos tan especiales con los que juntos hemos crecido: Julio Edgar, Chibebo, Lety Verdín, Alaín, Beto, Gustavo Saut, Miguel, Clemente, Iván, Bety, Luis Enrique, Nicolás, Ricardo, Irma, Angélica y Gustavo.

Al colectivo **La Colmena** por su apoyo y amistad: Mauricio, Karla, Octavio, Gina y Octavio.

A mi amigo incondicional Sergio Vaca; gracias, eres parte importante de todo.

A mis profesores y amigos: Leticia Verdín, Rodolfo Cárdenas, Roberto Rico, Sergio Cházaro, Ma. Elena Huidobro, Salvador Rodríguez, Claudia Diez y Manuel Mandujano.

A Michael: Gracias por darle tanta felicidad a mi vida.

A mis compañeros del CRAPA por ayudarme desde que los conocí.

A MIGAN, por Todo, gracias por ser parte importante en mi vida.

Y a todos les digo de corazón:

“Mis chavos, los odio a todos!!!!!!”

| ÍNDICE | Pagina |
|---|--------|
| Resumen..... | I |
| 1.Introducción..... | 1 |
| 2. Antecedentes..... | 4 |
| 3. Justificación..... | 9 |
| 4. Características de la especie de estudio..... | 11 |
| 5. Objetivos..... | 13 |
| 5.1 General..... | 13 |
| 5.2 Particulares..... | 13 |
| 6. Metodología..... | 14 |
| 6.1 Determinación de las características y condiciones de cultivo de <i>R. bictoniense</i> | 14 |
| 6.2 Aclimatización..... | 16 |
| 6.3 Análisis del medio de cultivo..... | 17 |
| 6.4 Diseño experimental resumido..... | 19 |
| 7. Resultados..... | 21 |
| 7.1 Establecimiento de las condiciones óptimas para el cultivo de <i>R.</i> <i>bictoniense</i> | 21 |
| 7.2 Medición de azúcares totales..... | 27 |
| 7.3 Crecimiento y desarrollo de <i>R. bictoniense</i> | 28 |
| 8. Análisis de Resultados..... | 38 |
| 8.1 Establecimiento de condiciones óptimas de cultivo para <i>R.</i> <i>bictoniense</i> | 38 |
| 8.2 Análisis del medio de cultivo..... | 42 |
| 8.3 Aclimatización..... | 45 |
| 9. Conclusiones..... | 47 |
| 10. Referencias | 49 |

RESUMEN

La micropropagación *in vitro* de las orquídeas puede ser hecha a partir de semillas, protocormos o explantes, principalmente de plántulas cultivadas *in vitro*, con fines de producción y conservación. En este trabajo se aplicaron estos procedimientos a una especie del género *Rhynchostele* (*R. bictoniense*), que reúne características de fácil manejo, buen desarrollo en el laboratorio y atractivo hortícola. Aunque *R. bictoniense* no está incluida en la Norma Oficial, como algunas de las especies cercanas, presenta poblaciones que empiezan a ser afectadas, al mismo tiempo que su biología se encuentra escasamente estudiada. El desarrollo óptimo de las orquídeas *in vitro* está ligado al conocimiento de su fisiología y dentro de ésta, un aspecto decisivo es la cantidad de carbono que los organismos incorporan del medio durante su crecimiento, lo que puede determinar su capacidad fotosintética dentro y fuera del laboratorio. El objetivo fue desarrollar una metodología de micropropagación dirigida a la preservación de esta especie, a partir de material cultivado *in vitro*, así como determinar la cantidad de carbohidratos absorbidos por la planta a partir del medio de cultivo y su efecto durante diferentes etapas de desarrollo. Se realizaron cultivos de protocormos, brotes y plántulas en medio Knudson C (KC), con cuatro tratamientos que incluyeron: medio basal sin aditivos; KC con agua de coco al 20%; KC con cinetina 0.5 mg/l y KC con agua de coco al 20% y cinetina 0.5 mg/l. Las condiciones de cultivo fueron de $12.2 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$, fotoperiodo de 16 h y temperatura de $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. La cuantificación de carbohidratos absorbidos por las plántulas a partir del medio de cultivo fue hecha por el método de antrona. La proliferación de protocormos, brotes y plántulas, fue favorecida por el tratamiento KC con cinetina y agua de coco en todas las fases de desarrollo y se inició la adaptación *ex vitro* de ejemplares que alcanzaron tallas de 12 a 15 cm en el cultivo *in vitro*. El mayor consumo de azúcares se observó en las etapas intermedias de desarrollo de los organismos disminuyendo en las últimas, lo que indicó que en esas etapas las plantas fueron capaces de funcionar en forma autótrofa. Esta metodología proporciona un protocolo general capaz de producir organismos en poco tiempo (8 meses) a partir de diferentes estructuras y es aplicable a la proliferación, preservación y conservación *ex situ* de este *Rhynchostele*. Se concluye que la mayor cantidad requerida de azúcares está directamente relacionada con las etapas tempranas del crecimiento y desarrollo de *R. bictoniense*.

1. INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae es una de las más grandes y diversas entre las plantas con flores, comprende aproximadamente 25,000 especies incluidas en más de 725 géneros (Dressler, 1981).

Su distribución es cosmopolita desde el Norte de Suecia y Alaska, hasta el sur de América, a excepción de las zonas polares y áreas situadas a más de 4000 m de altitud, pero la mayoría de las especies se encuentran en el trópico (Dressler, 1981).

En México las orquídeas se localizan en zonas montañosas, especialmente en altitudes de aproximadamente 2000 m. Los Estados de Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Guerrero poseen la mayor abundancia de especies, y los de Jalisco, México, Michoacán y las regiones más sureñas de Puebla y San Luis Potosí son Estados con una flora relativamente rica de orquídeas. Los estados de Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo, al ser lugares de baja altitud poseen un número relativamente pequeño de especies (Soto, 1988) .

Las estimaciones con respecto al número de especies han variado con el tiempo, en 1981 Dressler mencionaba que existían aproximadamente 660 especies registradas en México, mientras que Soto en 1988 llegó a indicar alrededor de 1,100 especies con la posibilidad de que con los constantes hallazgos se pudiera alcanzar la cifra de 1,200.

Estos datos nos hablan de la importancia que las orquídeas han adquirido en el cultivo *in vitro* a partir de la década de los sesentas (Pritchard, H. W. 1989) y que ha generado una serie de investigaciones que permitan la reproducción *in vitro* de las mismas.

Las orquídeas germinan asimbióticamente en un medio de cultivo después de la imbibición formando un pequeño cuerpo esférico denominado protocormo, a partir de cuya base surgen rizoides y a continuación primordios de raíces y hojas, todo lo cual permite distinguir etapas bien definidas que se usan en el cálculo de índices de crecimiento (Arditti, 1984; Pierik, *et al.*, 1988).

Otras estructuras generadas durante la propagación *in vitro* de las orquídeas derivan vegetativamente de hojas, raíces, tallo y, por su aspecto esférico o globoso, se denominan PLB (protocorm like body, cuerpos parecidos a protocormos), de los cuales es posible generar nuevas plantas, y continuar con el proceso de cultivo *in vitro*.

Las etapas de crecimiento y desarrollo son similares entre los diferentes géneros de orquídeas terrestres y epífitas y ayudan a prever los tiempos en los que será posible obtener plántulas de un tamaño determinado de una especie o híbrido de acuerdo con las condiciones de cultivo establecidas. La optimización de este desarrollo y su conocimiento tienen aplicaciones prácticas *per se*, pero también las tienen el conocer la fisiología y la potencialidad regenerativa de los protocormos usados como explantes.

Una vez que se logra la obtención y manejo adecuado de protocormos es necesario buscar los factores que permitan inducir enraizamiento, la producción de biomasa y área foliar de las plántulas que se obtienen a partir de éstos. Los factores que pueden estimular este crecimiento pueden ser: El uso de citocininas y auxinas, la intensidad luminosa y el fotoperíodo, el o los medios de cultivo, el gelificante utilizado, las características del envase en donde se desarrollan, la humedad y el adecuado intercambio de gases y así continuar con el proceso de adaptación fuera del laboratorio, el cual es el paso final en el proceso de micropropagación. Durante esta última etapa, las plantas tienen que

adecuarse a las nuevas condiciones ambientales de invernadero o de campo, y el pobre desarrollo del aparato fotosintético y de sus estructuras básicas son los mayores problemas para una mejor adaptación (Van Huylenbroeck, 1996 y Debergh, 1991).

Para el mejoramiento de los sistemas de cultivo de tejidos *in vitro* es importante la determinación de los niveles de absorción de los compuestos orgánicos e inorgánicos durante el cultivo; sin embargo, pocos han sido los estudios acerca de la absorción de los componentes del medio en plantas cultivadas *in vitro*, por lo que las preferencias y elecciones de los componentes orgánicos e inorgánicos de los medios se han basado en la experiencia y no en análisis científicos (Kishi, 1997).

Otra parte importante para el óptimo desarrollo de orquídeas *in vitro* es el conocimiento de su fisiología, la cual está muy relacionada con la cantidad de azúcares que absorben los organismos durante su cultivo, lo que puede determinar su capacidad fotosintética dentro y fuera del laboratorio.

Se han realizado diversos estudios sobre la optimización y reducción de los tiempos de crecimiento y desarrollo *in vitro* de especies e híbridos de orquídeas (*Odontoglossum bictoniense* X *brevifolium*, entre otros) de interés hortícola pero dado el número tan amplio de éstos, solo se han podido hacer adaptaciones limitadas, considerando que estos avances pueden aplicarse con éxito al cultivo de especies con fines de conservación *ex situ*, el presente trabajo pretende hacerlo con una de las especies mexicanas del género *Rhynchostele*.

2. ANTECEDENTES

No obstante la literatura creciente sobre la propagación *in vitro* de orquídeas en el mundo (Arditti y Ernst, 1993), la relacionada con el género *Rhynchostele* (= *Lemboglossum*, Halbinger, 1982) es sumamente escasa, al respecto sólo se conocen algunas referencias citadas por Arditti en 1978.

El uso de secciones de protocormos en la propagación *in vitro* de orquídeas no ha sido amplio y se ha dado sólo en algunos estudios (Fonnesbech, 1972; Lam, *et al.*, 1991). Sin embargo este es un método que se ha empleado con éxito en la propagación de *Cymbidium* y *Phalaenopsis*, dos de los géneros más demandados en el comercio. La proliferación de protocormos y de PLB permite incrementar el número de plántulas a partir de una planta que produce pocas semillas; de semillas que germinan en bajas proporciones ó de especies o híbridos que se muestran recalcitrantes para ser propagados a través de explantes comúnmente usados.

En contraposición con el empleo de protocormos, las experiencias de manejo de PLB son más frecuentes, debido a que su formación ocurre como primera señal de crecimiento organizado en diferentes tipos de explantes obtenidos de las orquídeas, tales como raíz (Stewart y Button, 1978; Kerbauy, 1991; 1993); hoja (Tanaka y Sakanishi, 1977) e inflorescencia (Lim-Ho y Lee, 1987). Aún en el caso de los protocormos, la proliferación que se obtiene a partir de secciones de ellos, corresponde a verdaderos PLB de los que surgirán más plántulas.

La proliferación de protocormos o PLB tiene cabida sobre todo si se usan medios con bajas concentraciones de hormonas (Lam, *et al.*, 1991), o bien complejos naturales como el agua de coco (Arditti y Ernst, 1993). Otros factores sobre los que se ha prestado atención en la multiplicación de

plantas *in vitro* son las concentraciones de gelificante, de sacarosa, el pH y aditivos orgánicos diversos (Kosai, 1997).

Como ejemplo de estudios de multiplicación *in vitro* tenemos el de Mauro, *et al*, quienes en 1994 probaron en *Cattleya aurantiaca* la influencia de diferentes dosis de bencilaminopurina (BAP) y ácido α -naftaleneacético (ANA), en el medio basal de Murashige y Skoog (MS). Ellos encontraron que para la multiplicación de brotes es útil el medio suplementado con la combinación de 10mg/l de BA y 0.1 mg/l de ANA, y para el desarrollo de plántulas con el incremento de hojas y biomasa de raíz emplearon el medio suplementado con 10mg/l de ANA, dosis que permitieron resultados satisfactorios.

Considerando que con el ejemplo anterior pudiera darse la tendencia a la utilización de medios de cultivo con concentraciones elevadas de reguladores de crecimiento que aceleraran la proliferación, resulta conveniente indicar que tales dosis podrían conducir a mutaciones no deseadas. Por esta razón la proliferación de protocormos ó de sus análogos (PLB) debe llevarse a cabo usando medios con bajas concentraciones de hormonas (Lam, *et al.*, 1991), o bien adicionando complejos naturales como el agua de coco (Van Overbeek, *et al.*, 1941; Ernst, 1967; Arditti y Ernst, 1993; entre otros).

Varios aditivos se han usado en el cultivo *in vitro*, tal es el caso del agua de coco, la cual posee una gran cantidad de componentes, entre los que encontramos algunas fitohormonas en diferentes concentraciones como: auxinas, 1,3 difenilurea, citocininas y giberelinas y se ha usado rutinariamente en un sinnúmero de métodos de propagación de orquídeas (Arditti y Ernst, 1993).

Diversos autores han probado los efectos del agua de coco en la propagación *in vitro* de orquídeas. Fonnesbech (1972) encontró como combinaciones y concentraciones óptimas las de ANA (10 μm) y cinetina (1 μm) para conseguir la proliferación de *Cymbidium* a partir de protocormos, en tanto que logró incrementar su crecimiento a través de la adición de triptona (3-4 gr/l), sacarosa (3-4%) y agua de coco (10-15%). Lam, *et al.*, 1991, compararon los efectos de aditivos orgánicos con los de una citocinina (2iP) en la proliferación de protocormos de *Phalaenopsis*, encontrando los mejores resultados en el tratamiento que solo incorporó agua de coco.

Kosai, *et al*, en 1997 hicieron una recapitulación de las técnicas de control ambiental para la producción de plantas cultivadas *in vitro*, concluyendo ocho puntos básicos para el mejoramiento del desarrollo *in vitro*. Estos autores también revisaron las causas que originan la falta de desarrollo fotosintético en estas plantas, destacando el problema de intercambio gaseoso que puede existir dentro de los envases de cultivo y la adición de azúcares al medio como fuentes de carbono, lo cual favorece el heterotrofismo en las plantas cultivadas y por lo tanto las bajas tasas fotosintéticas presentes en los cultivos. Este mejoramiento permite que al momento en que las plantas son sacadas del laboratorio, se adapten mejor a las condiciones fuera de éste.

Para definir el proceso de adaptación *ex vitro* se ha empleado el término aclimatización (Debergh, 1991). La diferencia entre aclimatación y aclimatización, es que el primero denota el proceso durante el cual, las plantas u otros organismos se ajustan o adaptan a un nuevo clima o situación como resultado de un proceso natural. La aclimatización implica que el humano tiene intervención y guía el proceso de ajustamiento (Debergh, 1991). Por lo tanto y para los fines propuestos en este trabajo se manejó el término aclimatización.

En relación con los carbohidratos que obtiene la planta, Van Huylenbroeck, *et. al.* (1996) determinaron que durante el proceso de adaptación *ex vitro* de plantas de *Spathiphyllum* (Araceae), la fotosíntesis se inhibió en las plantas cultivadas en medio con la concentración más alta de sacarosa (6%), mientras que en las cultivadas en medio con menor concentración (3%), no ocurrió la inhibición.

Kishi y Takagi (1997) estudiaron el medio de cultivo que utilizaron para *Dendrodium moniliforme* y *Darwinara Pretty Girl* y reportaron que al momento de la esterilización un 20% de la sacarosa contenida se transformó en glucosa y fructuosa, y que después de un mes de cultivo, este valor se incrementó del 44 al 73% dependiendo de la especie que se cultive. Estos autores concluyeron que la sacarosa presente en el medio después de la esterilización fue completamente absorbida por las plantas y encontraron algunos otros azúcares, aunque en mínima cantidad, como el sorbitol y el manitol que no se presentaron al inicio del experimento.

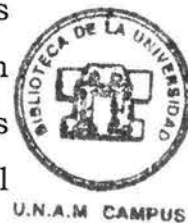
Vaz, *et al.*, (1998) estudiaron las variaciones del carbono durante la división y elongación celular de cultivo de raíces de *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae), en medio de cultivo MS basal adicionados con IBA y zeatina. Los medios adicionados con IBA presentaron incremento en los niveles de glucosa y fructuosa, a pesar de la reducción casi total de carbohidratos solubles. La morfogénesis fue inducida por la zeatina, inversamente relacionada con la expansión celular, coincidiendo con la acumulación de carbohidratos solubles en la raíz. Las yemas vegetales tuvieron altos niveles de carbohidratos, cuya concentración decayó progresivamente durante el desarrollo de las plantas. Estos autores sugieren que el carbono participa durante la expansión celular y que este proceso, en presencia de la zeatina, está ligado al metabolismo de los carbohidratos, en especial de la sacarosa que es de suma importancia en el desarrollo y metabolismo de las plantas, teniendo un papel en la

expresión genética de las orquídeas. Al continuar el desarrollo de la planta, las concentraciones de azúcar varían según las necesidades de cada parte del organismo.

Una de las metodologías ampliamente utilizadas para determinar la concentración de azúcares es el método de la antrona. Así, Mandujano, (1988), utilizó este método para determinar almidón en la cactácea *Escontria chiotilla* en diferentes fotoperíodos. La Asociación Argentina de Microbiología, en el artículo “La influencia del amaranto en la producción de α -amilasa empleando *Aspergillus Niger* nr1 3112”, reportó como método para determinar los carbohidratos totales el de antrona, descrito por Daniels, *et al.* en 1994. En el estudio realizado por Martínez-González, *et al.*, (2001) utilizaron el método de antrona descrito por Witham, *et al.*, (1971) para la cuantificación de azúcares totales en nopal tunero.

3. JUSTIFICACIÓN

La micropropagación de las orquídeas utiliza semillas, meristemos apicales, yemas, explantes de hoja, raíz e inflorescencia (Arditti, 1993), pero en menor escala, los propios protocormos producidos como resultado de la germinación. De éstos es factible derivar más plantas cuando la germinación es pobre y se busca obtener material genéticamente variable o bien, explorar nuevas rutas de propagación en casos en los que las tradicionales del cultivo de tejidos no ofrecen los resultados esperados (Lam, *et al.*, 1991). Por lo tanto, para mejorar estas rutas se emplean medios adicionados con reguladores de crecimiento y/o complejos orgánicos. Para la mayoría de las orquídeas mexicanas (un total aproximado de 1100 especies), no hay protocolos de micropropagación que signifiquen un punto de partida hacia programas de conservación *in situ* y *ex situ*, con excepción de algunos pocos (*p. e.* Rubluo, *et al.*, 1993).



IZT.

El estado de conservación actual de *R. bictoniense* no está definido, aparentemente no está amenazada, por lo mismo no está incluida en la NOM-059-ECOL-1194, pero la planta está sujeta a extracción indiscriminada en el área geográfica de su distribución, y en México está afectada por la construcción de caminos, la tala, los incendios y la venta en mercados regionales y de la Ciudad de México. El género está representado en México por 15 especies, 7 de las cuales son endémicas distribuidas en el Pacífico y el Atlántico. Por lo tanto es necesario establecer un estudio integral que nos permita conocer más acerca de su biología, ya que no existe información suficiente a pesar de ser una especie ampliamente utilizada en la horticultura, y así desarrollar una metodología de micropropagación que conduzca a su preservación permitiendo su cultivo exitoso *ex vitro*.

Muchos géneros de orquídeas han sido propagados *in vitro*, manejando factores diversos que han favorecido su multiplicación y crecimiento (Arditti y Ernst, 1993). Sin embargo, no todas las orquídeas han sido investigadas y ese es el caso del género *Rhynchostele*. Este género, recientemente validado desde el punto de vista taxonómico (Soto, *et. al.*, 1993), agrupa actualmente a especies que antes fueron incluidas dentro de los géneros *Odontoglossum* y *Lemboglossum* (Halbinger, 1982).

Rhynchostele bictoniense es notable por sus características hortícolas especiales las cuales la han llevado a ser elegida con frecuencia en programas de hibridación, (Rittershausen y Rittershausen, 1979; Scarfield, 1979; Carpenter, 1988 y otros) creando híbridos sobresalientes como *Odontoglossum summit* (*Odontoglossum bictoniense* X *brevifolium*) entre otros más.

4. CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE DE ESTUDIO

Rhynchosstele bictoniense, es una planta terrestre o litófito, su morfología muestra: pseudobulbos ovoides a elípticos, comprimidos, de 6-3 cm, con corto rizoma, envueltos con vainas desde la base y terminando en hojas de diversos tamaños. Hojas de una a tres en el ápice del pseudobulbo; elíptico-oblongas, elíptico-lanceoladas o lineares, agudas o acuminadas, conduplicadas en la base, de 11.5 a 45 cm de largo y 1.5 a 5.5 cm de ancho. Inflorescencia de la base de los pseudobulbos de 40 a 80 cm de largo, con largas brácteas, incluyendo el racimo simple o ramificado. Brácteas florales anchamente elípticas a lanceoladas, subagudas hasta acuminadas, de 0.7 a 2 cm de largo. Flores numerosas, vistosas, de aproximadamente 4 cm de diámetro. Ovarios pedicelados de 2.5 a 5 cm de largo. Sépalos y pétalos verde pálido o verde amarillento, con bandas transversales pardas o café rojizas. Sépalo dorsal elíptico-lanceolado, agudo a subobtusado en el ápice, ligeramente recurvado, cóncavo. Dorsalmente carinado de 2.1 a 2.7 cm de largo y 0.5 a 0.6 cm de ancho. Pétalos oblanceolados a elíptico-lanceolados, obtusos a agudos, oblicuos, de 1.8 a 2.3 cm de largo y 0.4 a 0.8 cm de ancho. Labelo con una uña corta de 2 a 3 mm unida a la base de la columna, lámina anchamente subcortada, redondeada a aguda en el ápice, los bordes ocasionalmente crenulado-ondulados, blanca, lilácea o rosada, inmaculada, de 1.5 a 3 cm de largo y 1.6 a 2.4 cm de ancho. Callo carnoso, con dos láminas laterales altas, como los bordes de una barca y terminación bidentada. Columna esbelta, de 1.2 a 1.5 cm de largo, con aurículas subcuadradas en cada lado del ápice. Cápsula ancha, elipsoide, de casi 4 cm de largo. (Halbinger, 1982) (Fig. 20).

Esta planta fue introducida al cultivo en Inglaterra en 1835, pero tomó mucho tiempo establecerla en el gusto de los cultivadores y usarla en programas de hibridación. Las características notables de esta planta son

la producción de inflorescencias hasta de 80 cm de longitud, erguidas, a veces ramificadas, con muchas flores dispuestas en la misma dirección, de larga duración, coloración variable y la producción de híbridos de gran calidad (Rittershausen y Rittershausen, 1979; Carpenter, M., 1988, entre otros).

Floración: Ocurre de mayo a junio y de septiembre a octubre.

Distribución: En México (Veracruz y Chiapas), en Guatemala y El Salvador, terrestre o litófita en bosques húmedos, de 1800 a 2800 m de altitud.

5. OBJETIVOS

5.1. General:

- Diseñar una metodología de micropropagación *in vitro* eficiente para la orquídea *Rhynchostele bictoniense*, que conduzca a su conservación *ex situ*.

5.2. Particulares:

- Promover la proliferación de *R. bictoniense*, a partir de la multiplicación de protocormos, brotes y plántulas cultivados *in vitro*.
- Determinar la combinación de factores (medio de cultivo, estado de éste, combinación de las fitohormonas contenidas en el agua de coco y la concentración de cinetina) que pueden promover en condiciones de laboratorio el crecimiento de *R. bictoniense* y su desarrollo.
- Determinar qué reguladores de crecimiento y qué concentraciones de ellos estimulan la producción de biomasa y el desarrollo en esta especie.
- Determinar la cantidad de carbohidratos absorbidos por la planta del medio de cultivo, durante diferentes etapas de desarrollo buscando determinar su efecto en el crecimiento y desarrollo.
- Iniciar el proceso de aclimatización de plantas de *R. bictoniense*.

6. METODOLOGÍA

6.1. Determinación de las características y condiciones de cultivo.

El material utilizado consistió en protocormos previamente obtenidos a través de la germinación asimbiótica en el laboratorio un año antes y mantenidos bajo condiciones de obscuridad y desecación gradual (Kishi y Takagi, 1997) a 24 ± 2 °C en el medio Knudson C (Sigma 4003, Tabla 1). Los protocormos fueron utilizados enteros y seccionados. El experimento se inició con poco material (32 protocormos, uno por frasco y 4 repeticiones por tratamiento) debido a que, a pesar de que se contó con suficiente semilla para la obtención de protocormos, la germinación de esta especie es pausada e irregular tomando en ocasiones varios meses, las semillas se obtuvieron de plantas cultivadas provenientes originalmente de un bosque de pino-encino del Municipio de Tlacolulan en la parte central del Estado de Veracruz.

Los medios de cultivo empleados fueron dos versiones del medio Knudson C, (Knudson, 1951) preparados por Sigma (K-4003 y K-4128, Tabla 1). Ambas tienen un uso amplio para germinar semillas de muchas especies, pero difieren en el contenido y fuente de nitrógeno, calcio y potasio. En pruebas realizadas previamente, el medio K-4003 (SIGMA) favoreció la germinación y crecimiento de varios *Rhynchostele*, incluido *R. bictoniense*, mientras que del medio K-4128 (SIGMA) no se contó con datos suficientes (E. Aguirre, com. pers.) por ello fue necesaria una comparación de su efectividad. En esta fase del trabajo se estudiaron cuatro factores, el primero constituido por los medios K-4003 y K-4128 (SIGMA) adicionados con agua de coco al 20%, el segundo constituido por las fases sólidas y líquidas del medio en sus dos versiones, el tercero por la concentración de cinetina 0.5 mg/l y 1 mg/l y, por último, el uso de protocormos enteros y fraccionados. Todo lo anterior para cada una de las formulaciones de KC.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo

| SALES INORGÁNICAS | MEDIO KC 4003 | MEDIO KC 4128 | MEDIO KC ORIGINAL |
|--|------------------|------------------|----------------------|
| | Cantidad mg/l | Cantidad mg/l | Cantidad mg/l |
| Sulfato de Amonio | 500.0 | 500.0 | 500.0 |
| Nitrato de calcio 4H ₂ O | 694.4 | 347.2 | 1000.0 |
| Sulfato de cobre 5H ₂ O | 0.0624 | 0.0 | 0.0 |
| Sulfato ferroso 7H ₂ O | 25.0 | 25.0 | 25.0 |
| Sulfato de Magnesio Anhidro | 122.25 | 122.25 | 0.0 |
| Sulfato de Magnesio 7H ₂ O | 0.0 | 0.0 | 250.0 |
| Sulfato de Magnesio | 5.682 | 5.682 | 7.5 |
| Trióxido de molibdeno | 0.016 | 0.0 | 0.0 |
| Fosfato de Potasio Monobásico | 250.0 | 250.0 | 250.0 |
| Sulfato de Zinc 7H ₂ O | 0.331 | 0.0 | 25.0 |
| Sacarosa | 20 000 | 20 000 | 20 000 |

El empleo de cinetina como regulador de crecimiento se debió a su papel en propiciar el crecimiento e incremento de biomasa, así como su enraizamiento y debido a que es la más utilizada en géneros afines (Hurtado, 1994).

La evaluación referente a la multiplicación y crecimiento, se hizo contando el número de brotes bien definidos, así como la formación de cuerpos parecidos a protocormos y crecimiento y desarrollo de plántulas.

De todas estas variaciones se obtuvo la mejor combinación para el desarrollo de protocormos. Definiendo medio de cultivo, concentración de reguladores de crecimiento y el uso de protocormos enteros o fraccionados.

La temperatura a la que se mantuvieron los organismos fue la del laboratorio (22 ± 2 °C) y se registró con un termómetro de máxima mínima, durante todo el experimento.

Al generarse los brotes a partir de protocormos, se subcultivaron en el medio que mejores resultados produjo, para así permitir la formación de plántulas y propiciar el aumento de biomasa.

Después que los protocormos formaron brotes, estos se subcultivaron para la continuación de su desarrollo. Se utilizaron envases transparentes gerber y magenta GA7 con tapas translúcidas para permitir una mayor penetración de luz ($12.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y un mayor volumen en el caso del segundo para las fases de mayor crecimiento.

A continuación, y dependiendo del tamaño, se continuó con el tratamiento o bien se transplantaron a balsas de membranas con microporos de polipropileno (Adelber, 1993) en envases magenta GA7 (SIGMA) donde siguieron con el incremento de biomasa, y así concluir su crecimiento dentro del laboratorio y continuar con la fase de aclimatización.

6.2. Aclimatización

Después de obtener plantas bien desarrolladas (pseudobulbos, raíces y hojas), de un tamaño de 10 cm como mínimo, se procedió a la fase de aclimatización *ex vitro*, la cual consistió en trasplantar los organismos a envases con una mezcla de peat-mos, agrolita y corteza de abeto, suprimiendo el medio de cultivo. La humedad se mantuvo solamente hidratando la mezcla con agua estéril en envases transparentes con tapa

dentro del laboratorio, para su posterior manejo fuera de éste, un mes después. Para el cultivo fuera del laboratorio se utilizaron envases de unicel, con una base de tezontle y la mezcla descrita anteriormente, cuidando de cubrir con una bolsa de plástico a los organismos durante las primeras semanas, a fin de mantener la humedad y la temperatura especialmente en los meses fríos del año.

6.3. Análisis del medio de cultivo

Los análisis correspondientes a la absorción de azúcares, se realizaron después de subcultivar los organismos cada 45 días a medio fresco, utilizando el medio así desocupado para dichos análisis.

Un método confiable y relativamente sencillo es la cuantificación de carbohidratos por el método de antrona (9-oxiantraceno), que reacciona con los carbohidratos dando un color azul característico. Esta reacción constituye la base para la determinación de hexosas, aldopentosas y ácidos hexurónicos, ya sean libres o formando parte de polisacáridos. (Osborne, 1986.)

En la determinación de azúcares totales en el medio, se emplearon las muestras obtenidas después de cada transplante (correspondientes a 45, 90, 135, 180 y 225 días), así como muestras de medios sin utilizar de los diferentes tratamientos y del agua de coco pura. Esta determinación se realizó con base en el método de cuantificación de carbohidratos totales utilizables (método manual de antrona de Clegg), modificándolo para las necesidades de este estudio, el cual se describe a continuación:

Se colocaron 25 μ l de muestra de cada uno de los frascos (medio de cultivo) y 5 ml de agua destilada, de ésta solución se tomaron 500 μ l, y se les agregaron 500 μ l de agua destilada.

La curva patrón se obtuvo con una solución de glucosa (100 µg/ml) y se realizó de la siguiente manera: Se colocaron 6 tubos, siendo el primero el blanco y del segundo al sexto con concentraciones crecientes de glucosa como se observa en la tabla 2.

Tabla 2. Datos para la curva patrón.

| Tubo | Glucosa µl | Agua ml | Reactivo de antrona ml |
|--------|---------------|------------|---------------------------|
| Blanco | 0 | 1000 | 5 |
| 1 | 60 | 940 | 5 |
| 2 | 80 | 920 | 5 |
| 3 | 100 | 900 | 5 |
| 4 | 200 | 800 | 5 |
| 5 | 400 | 600 | 5 |

A cada uno de los tubos se les agregaron 5 ml de la solución de antrona preparada como a continuación se indica:

Antrona al 0.1% disuelta en una solución de ácido sulfúrico al 70%, preparada al momento de ser utilizada.

Cada uno de los tubos se agitaron para homogenizar la solución y se colocaron en baño maría por 12 minutos, se dejaron enfriar y se procedió a hacer mediciones en el espectrofotómetro modelo Perkin Elmer UV/VIS Spectromer Lambda 2S a 630 nm. Esta técnica se realizó para cada uno de los tratamientos en cada una de las etapas de desarrollo (45, 90, 135, 180 y 225 días de cultivo), así como en el medio de cultivo sin ningún aditivo y al agua de coco sola. Después de esto se realizó la conversión a mg/ml de sacarosa para cada uno de los tubos, cuyos valores se promediaron para poderlos graficar.

6.4. DISEÑO EXPERIMENTAL RESUMIDO.

Tabla 3. Fase 1 Combinación de factores óptimos de cultivo

| Protocormos enteros | | | | Protocormos Fraccionados | | | |
|---------------------|---------|---------|---------|--------------------------|---------|---------|---------|
| KC 4003 | | KC 4128 | | KC 4003 | | KC 4128 | |
| Sólido | Líquido | Sólido | Líquido | sólido | Líquido | Sólido | líquido |
| Cinetina 0.5 mg/l | | | | Cinetina 1 mg/l | | | |
| 4 rep | 4 rep | 4 rep | 4 rep | 4 rep | 4 rep | 4 rep | 4 rep |

- La unidad experimental en esta fase del estudio fue de un frasco con 20 ml de medio de cultivo y un solo protocormo, y cada tratamiento contó con 4 réplicas.
- **Todos los tratamientos con agua de coco 20%.**
- Prueba estadística para determinar la significancia de los tratamientos: Análisis de varianza factorial.
- Factores de estudio: Medios de cultivo (KC4003 y KC4128), fases sólidas o líquidas del medio, concentración de cinetina y el uso de protocormos enteros o fraccionados.

Tabla 4. Definición del tratamiento óptimo y del uso de protocormos.

| Medio KC 4003 Líquido Cinetina 0.5 mg/l y Agua de coco 20% | |
|---|-----------------------------------|
| Protocormos enteros | Protocormos fraccionados |
| 130 | 120 fracciones (60 protocormos) |
| 65 repeticiones | 60 repeticiones (30 por fracción) |

Al obtener un mayor número de organismos se realizó una segunda prueba con el mejor tratamiento, con dos unidades experimentales (protocormo) por frasco y un mayor número de replicas:

Tabla 5. Fase 2 Análisis de carbohidratos

| | | | |
|-----------------|-------------------------------|----------------------------------|---|
| Medio KC | Medio KC con agua de coco 20% | Medio KC con cinetina (0.5 mg/l) | Medio KC con agua de coco (20%) y cinetina (0.5 mg/l) |
| 11 repeticiones | 11 repeticiones | 11 repeticiones | 11 repeticiones |

- Cada repetición (frasco) con dos unidades experimentales (protocormos).
- Factores de estudio: Los cuatro tratamientos de cultivo.

Tabla 6. Fase 3 Desarrollo de organismos y aclimatización

| |
|---|
| Medio de cultivo seleccionado |
| Combinación de reguladores de crecimiento |
| Extracción del laboratorio |

- Cada repetición (frasco) con 2 unidades experimentales (protocormos).
- Conteo de organismos desarrollados (estructuras completas y definidas).

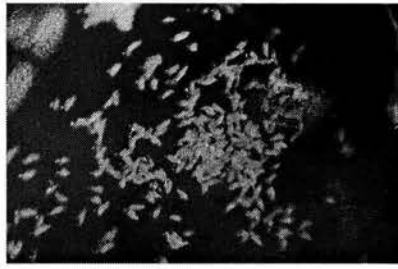
7. RESULTADOS

7.1. Establecimiento de las condiciones óptimas para el cultivo de *R. bictoniense*.

Dado que el propósito de este trabajo consistió en desarrollar una metodología que permitiera el crecimiento y desarrollo de *R. bictoniense* a partir de explantes de material cultivado *in vitro*, la primera fase del mismo, se dirigió a establecer la efectividad del medio de cultivo, su estado más conveniente, sólido o líquido, y el tipo y la concentración de reguladores de crecimiento más eficaces.

En la primera fase del experimento se subcultivaron protocormos enteros o fraccionados en los medios K-4003 y K-4128 sólidos o líquidos adicionados con agua de coco y cinetina a 1 mg/l. La mayoría de los protocormos fraccionados no presentó cambios en cuanto a crecimiento (actividad) (8/16) o murió (7/16) y sólo un protocormo tuvo indicios de brote en el medio K-4128 sólido (Fig. 2). La muerte de los protocormos se debió probablemente a la síntesis de metabolitos secundarios y a la concentración de cinetina utilizada, ya que estos mostraron claros signos de oxidación evidenciados por la sustitución del color verde brillante por un color café oscuro en las partes expuestas del tejido.

Cuando se cultivaron protocormos enteros en los mismos medios, el número de ellos que murió fue menor (5/16), 2 mostraron indicios de brote en el medio K-4003 sólido y 9 no presentaron crecimiento (Figs. 3 y 4).



a



b

Fig. 1. a) Semillas de *R. bictoniense* y b) protocormos antes de ser colocados en los tratamientos.

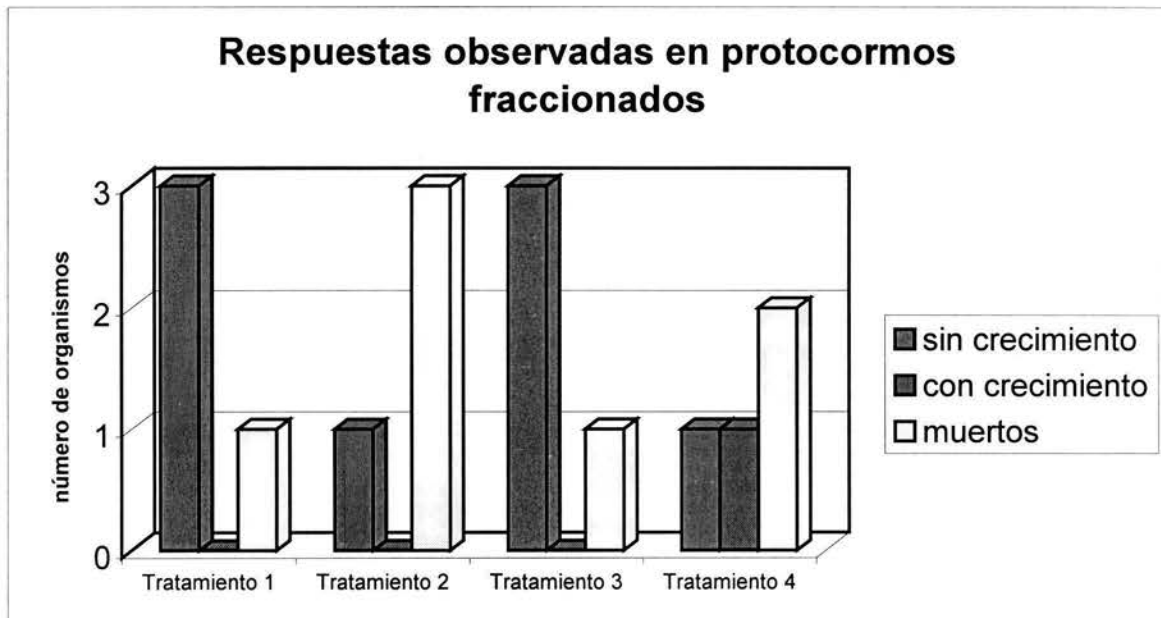


Fig. 2. Respuestas mostradas por protocormos fraccionados después de 45 días de cultivo (primera fase de desarrollo) en el tratamiento que se indica, adicionado en cada caso con 1 mg/l de cinetina y 20% de agua de coco. Tratamiento 1: K-4003, líquido; Tratamiento 2: K-4003, sólido; Tratamiento 3: K-4128 líquido y tratamiento 4: Kc 4128 sólido. Las barras muestran la suma de las replicas por tratamiento.

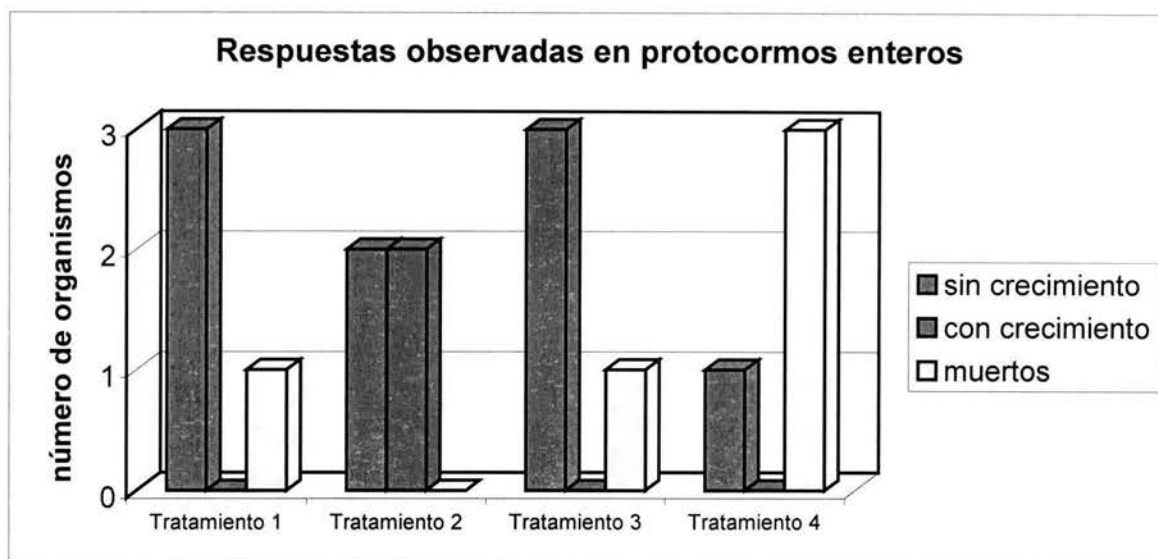


Fig. 3. Respuestas mostradas por protocormos enteros después de 45 días de cultivo (primera fase de desarrollo) en el tratamiento que se indica, adicionado en cada caso con 1 mg/l de cinetina y 20% de agua de coco. Tratamiento 1: K-4003, líquido; Tratamiento 2: K-4003, sólido; Tratamiento 3: K-4128 líquido y tratamiento 4: Kc 4128 sólido. Las barras muestran la suma de las replicas por tratamiento.

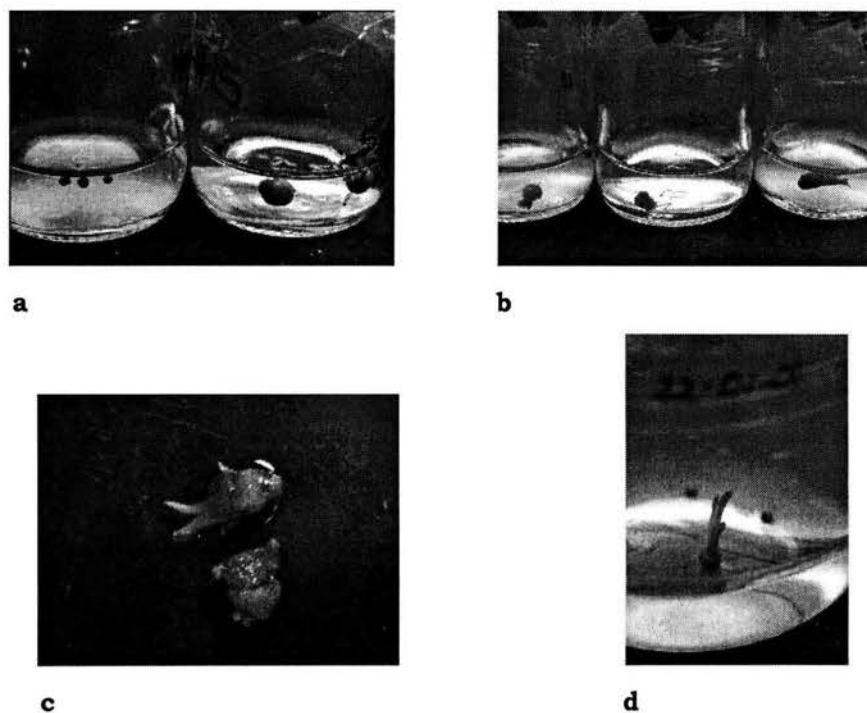


Fig. 4. a) Protocormos sin crecimiento (izquierda) y con crecimiento presente por aumento de tamaño (derecha); b) Protocormos en crecimiento e inicios de brote; c) Protocormos muertos por oxidación y d) Inicio de brote en medio sólido.

Con el propósito de evaluar el efecto de la concentración de cinetina sobre el crecimiento y desarrollo de los protocormos, se repitieron los experimentos descritos líneas arriba pero disminuyendo a la mitad la concentración de cinetina. Cuando se cultivaron protocormos fraccionados en los medios con menor cantidad de cinetina (0.5 mg/l), el número de ellos que presentó indicios de brotes fue 3/16, los que no presentaron crecimiento fueron 5 y los que murieron fueron 8 (Fig. 5).

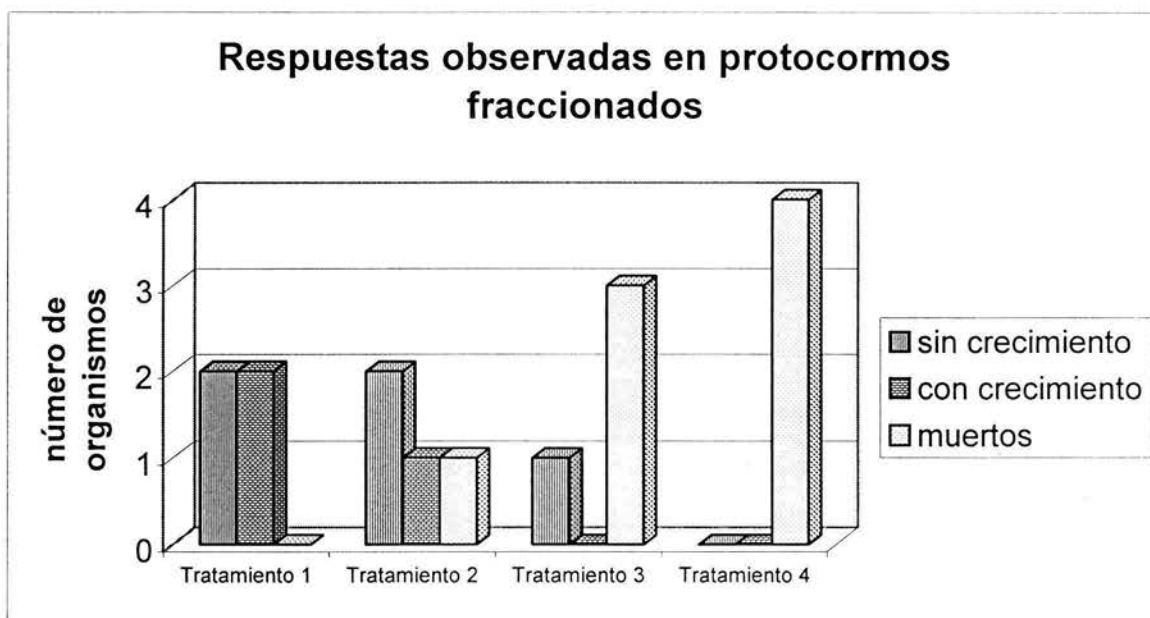


Fig. 5. Respuestas mostradas por protocormos fraccionados después de 45 días de cultivo (primera fase de desarrollo) en el tratamiento que se indica, adicionado en cada caso con 0.5 mg/l de cinetina y 20% de agua de coco. Tratamiento 1: K-4003, líquido; Tratamiento 2: K-4003, sólido; Tratamiento 3: K-4128 líquido y tratamiento 4: Kc 4128 sólido. Las barras muestran la suma de las replicas por tratamiento.

Cuando se subcultivaron protocormos enteros en los medios con menor cantidad de cinetina, el número de ellos que presentó indicios de brotes fue 6/16, los que no presentaron crecimiento fueron 8 y los que murieron fueron solamente 2 (Fig. 6).

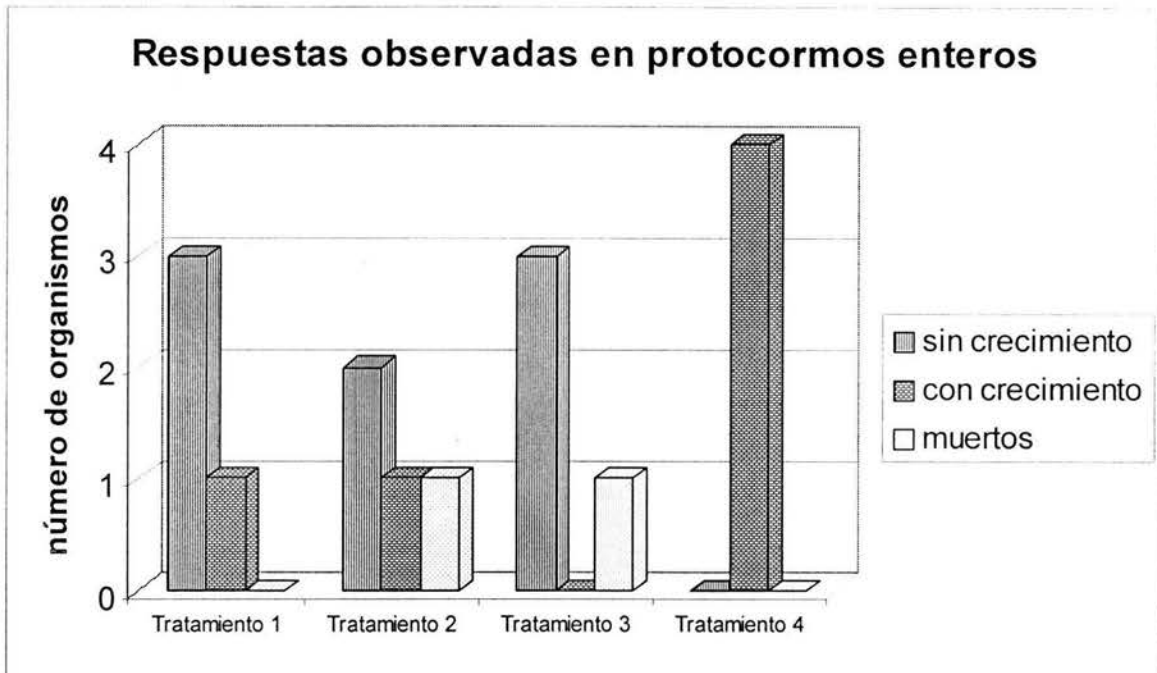


Fig. 6. Respuestas mostradas por protocormos enteros después de 45 días de cultivo (primera fase de desarrollo) en el tratamiento que se indica, adicionado en cada caso con 0.5 mg/l de cinetina y 20% de agua de coco. Tratamiento 1: K-4003, líquido; Tratamiento 2: K-4003, sólido; Tratamiento 3: K-4128 líquido y tratamiento 4: Kc 4128 sólido. Las barras muestran la suma de las replicas por tratamiento.

Una vez encontradas las mejores condiciones de cultivo: Medio K-4003 líquido y adicionados con cinetina 0.5 mg/l, utilizamos un mayor número de protocormos para confirmar las respuestas positivas obtenidas. Cuando se sembraron protocormos fraccionados, el 64% (77/120) murió (Fig. 7), en su gran mayoría por oxidación y una fracción pequeña lo hizo por contaminación; en tanto que sólo 33% (43/130) de los enteros murieron, en su mayoría por contaminación. Los porcentajes de protocormos sin crecimiento fueron: 20.8% (25/120) para los fraccionados y 36.9% (48/130) para los enteros. El 23.2% de los protocormos (58/250) mostraron indicios de brotes; de éstos 32.8% (19/58) fueron fraccionados y 67.2% (39/58) fueron enteros (Figs. 7 y 8).

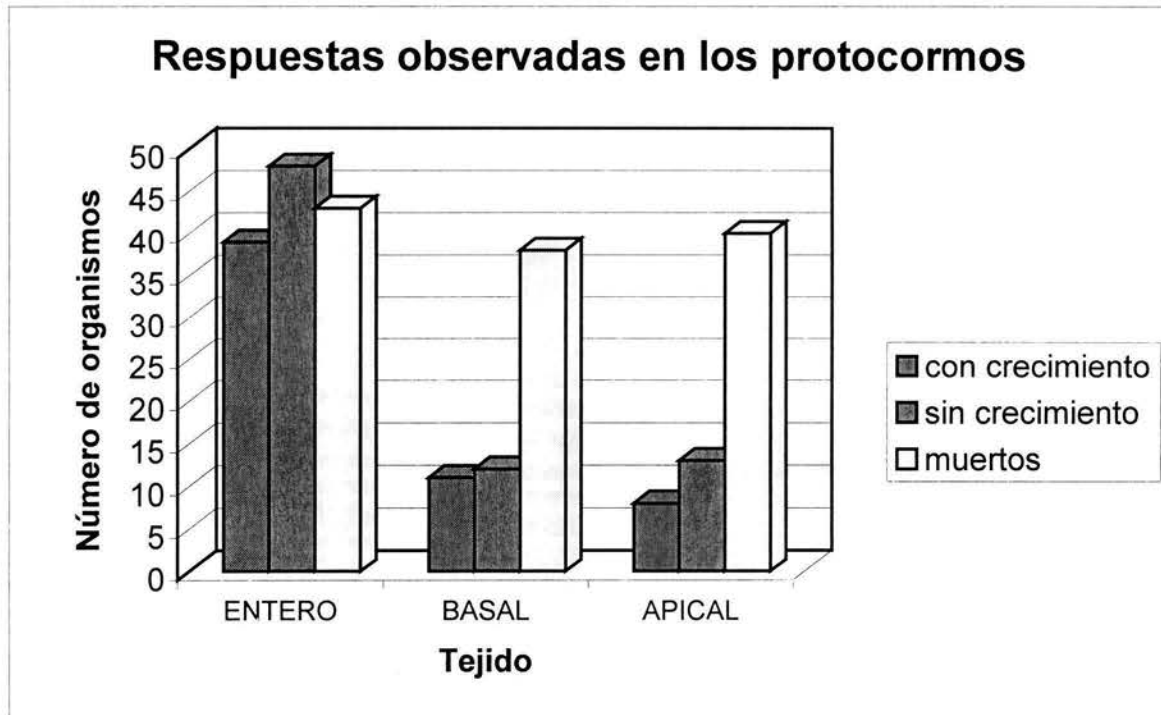


Fig. 7. Respuestas mostradas por protocormos después de 60 días de cultivo en medio K-4003, adicionado con agua de coco al 20% y cinetina a 0.5 mg/l, en sus tres diferentes formas de cultivo: enteros y fraccionados en dos partes (basal y apical).

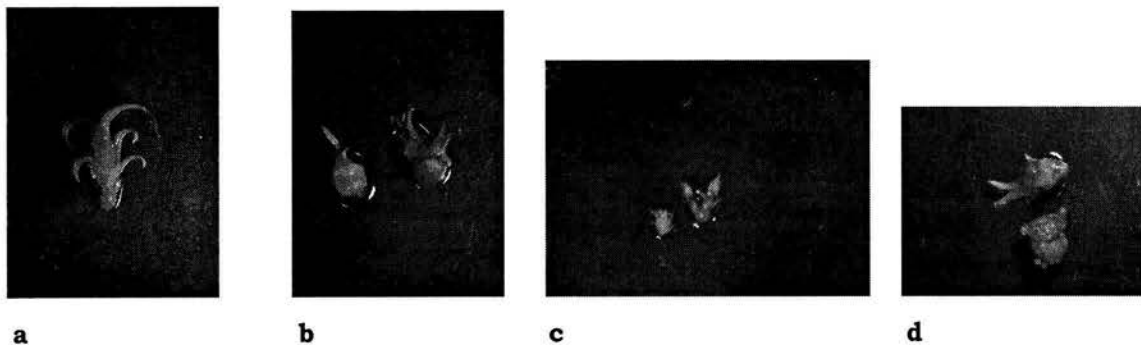


Fig. 8. a) Brote obtenido a partir de protocormo entero después de 60 días de cultivo; b) Inicios de brotes en protocormos fraccionados, después de 60 días de cultivo; c) Inicios de brote a partir de protocormos fraccionados (izquierda), y de protocormos enteros (derecha); d) Protocormos muertos por oxidación.

7.2. Medición de azúcares totales

Con el propósito de determinar el tiempo en que la planta deja de consumir azúcares del medio, como un indicador de que ésta es autosuficiente debido a que ha comenzado a fotosintetizar, cuantificamos la concentración de azúcares totales en los medios de cultivo a distintos tiempos de desarrollo de los explantes, por el método de la antrona. En cada uno de estos tiempos se analizaron también las respuestas de los protocormos.

En el tiempo 0 la concentración de azúcares totales en el medio K-4003 sin aditivos (Control) o adicionado con 0.5 mg/l de cinetina (Tratamiento 2) fue de 20.98 y 20.13 mg/ml respectivamente. Esta concentración disminuyó 25% a los 45 días de cultivo; a los 90 y 135 días los azúcares del medio disminuyeron un 38%. El consumo de azúcares por los brotes disminuyó a partir de los 180 días en un 45%, como puede inferirse por el incremento de azúcares en el medio, cuya concentración se estabilizó a los 225 días, alcanzando valores similares a los correspondientes a 45 días. Las concentraciones iniciales de azúcares en el medio K-4003 con agua de coco (tratamiento 1) o con agua de coco más cinetina (tratamiento 3) fueron superiores a 20 mg/ml. Estas concentraciones disminuyeron 56% y 60.7% a los 45 días en los tratamientos 1 y 3, respectivamente. A los 90 días el medio sujeto al tratamiento 1 tuvo un aumento de azúcares con respecto a la cifra obtenida a los 45 días, pero menor a la registrada inicialmente. El consumo de azúcares por los brotes sujetos al tratamiento 3 fue de 64.5% con respecto al observado a los 45 días. A partir de los 135 días el consumo de azúcares por los brotes disminuyó paulatinamente, de modo que a los 225 días la concentración de azúcares en los medios (tratamientos 1 y 3) alcanzaron valores similares a los del inicio del experimento (Fig. 9).

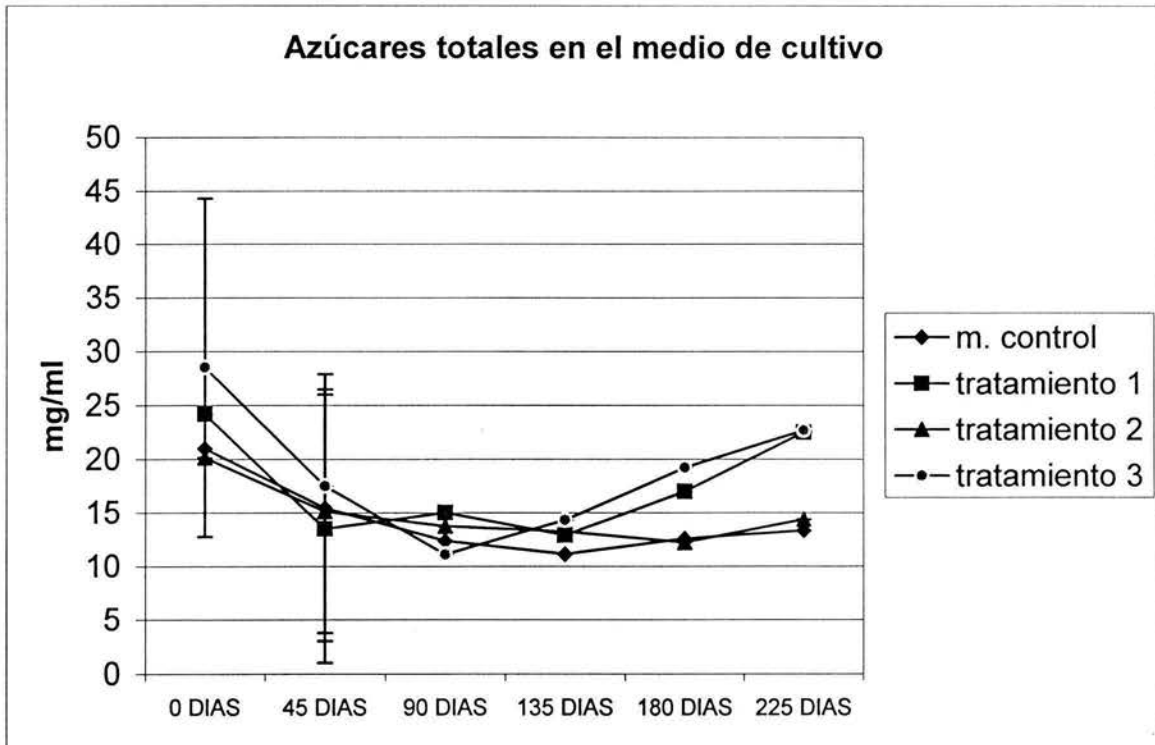


Fig. 9. mg/ml de azúcares totales en el medio de cultivo en diferentes etapas de desarrollo. Control.- Medio Kc 4003; Tratamiento 1.- Medio K-4003 con agua de coco 20%; Tratamiento 2.- Medio K-4003 con cinetina 0.5 mg/l; Tratamiento 3.- medio K-4003 con agua de coco 20% y cinetina 0.5 mg/l. Al inicio del experimento se midieron medios de cultivo con los diferentes tratamientos sin utilizar (0 días) para determinar la cantidad de azúcar inicial, así como la medición del agua de coco sola y su resultado fue: Agua de coco sola: 21.418 mg/ml. Las desviaciones estándar que se muestran corresponden a las más altas presentadas por tratamiento durante el experimento.

7.3. Crecimiento y desarrollo de *R. bictoniense*.

Al mismo tiempo que se tomaban las muestras de medios de cultivo para medir azúcares totales, se observaron las respuestas de las plantas a lo largo del tiempo. Se observaron diversas respuestas en todos los tratamientos a los 45 días: sin cambio (20/88); incremento de tamaño de los protocormos (37/88); formación de PLB (11/88); indicios de brote (9/88) y muertos (12/88). De todos ellos 7 correspondieron al tratamiento

1 y murieron por contaminación, en tanto que los de los demás tratamientos murieron por oxidación (Fig. 10).

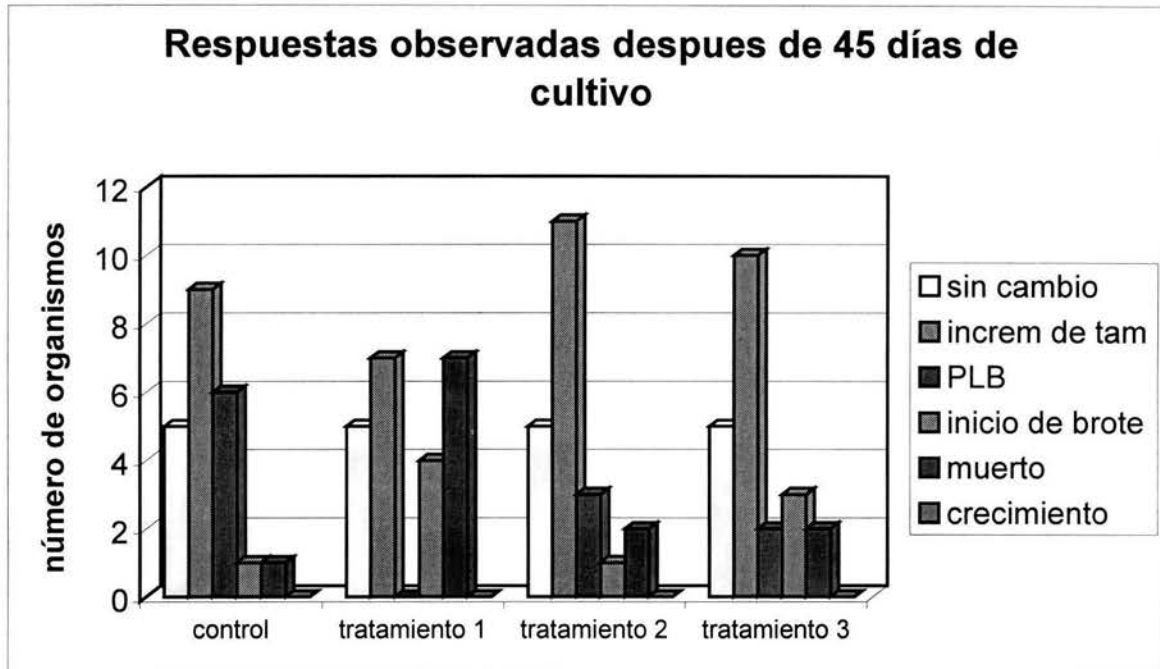


Fig. 10. Respuestas de los protocormos observadas después de 45 días de cultivo, antes de la cuantificación de azúcares totales. Control.- Medio K-4003; Tratamiento 1.- Medio K- 4003 y agua de coco 20%; Tratamiento 2.- Medio K-4003 y cinetina 0.5 mg/l; Tratamiento 3.- Medio K-4003, cinetina 0.5 mg/l y agua de coco 20%. Las barras muestran la suma de los protocormos.

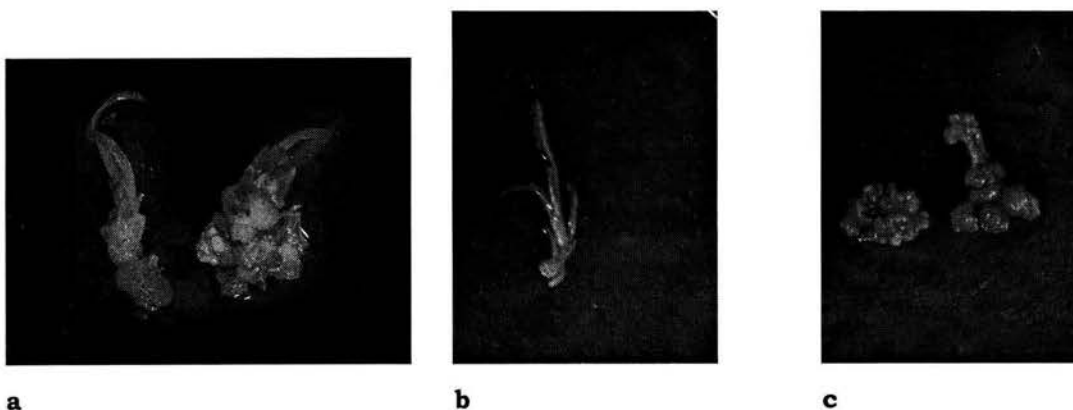


Fig. 11. a) Diferencias entre un protocormos formando brote (izquierda) y PLB (derecha); b) Crecimiento de un brote, nótese el aumento de tamaño y la presencia de hojas y c) Formación de PLB'S con inicio de oxidación.

A los 90 días de cultivo, el incremento de tamaño en los protocormos continuó siendo la respuesta más frecuente en todos los tratamientos (32/88); seguida por los inicios de brote (23/88), formación de PLB (12/88), muertos (15/88) y sin cambio (6/88). El desarrollo fue más evidente en los organismos cuyo medio contenía agua de coco y agua de coco con cinetina. (Figs. 11 y 12).

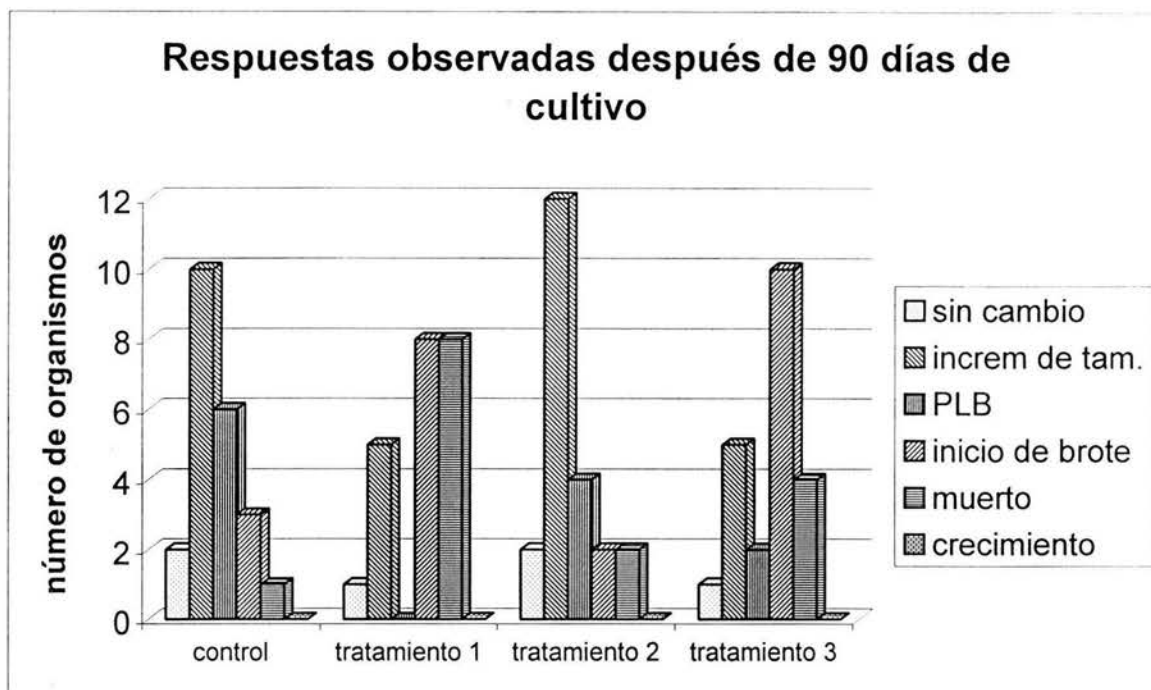


Fig. 12. Respuestas de los protocormos después de 90 días de cultivo, antes de la cuantificación de azúcares totales. Control.- Medio Kc 4003; Tratamiento 1.- Medio K- 4003 y agua de coco 20%; Tratamiento 2.- Medio K-4003 y cinetina 0.5 mg/l; Tratamiento 3.- Medio K-4003, cinetina 0.5 mg/l y agua de coco 20%. Las barras muestran la suma de los protocormos.

Al cumplirse los 135 días de cultivo, el desarrollo de brotes fue la respuesta más encontrada en los tratamientos (35/88), seguida por la presencia de PLB (17/88), incremento de tamaño y muertos (15/88 cada uno), crecimiento y desarrollo de los brotes (3/88), y solo 3 organismos sin cambio. Los protocormos sometidos a los tratamientos control y 2 presentaron una mayor tendencia a la formación de PLB. (Figs. 11 y 13).

Respuestas observadas después de 135 días de cultivo

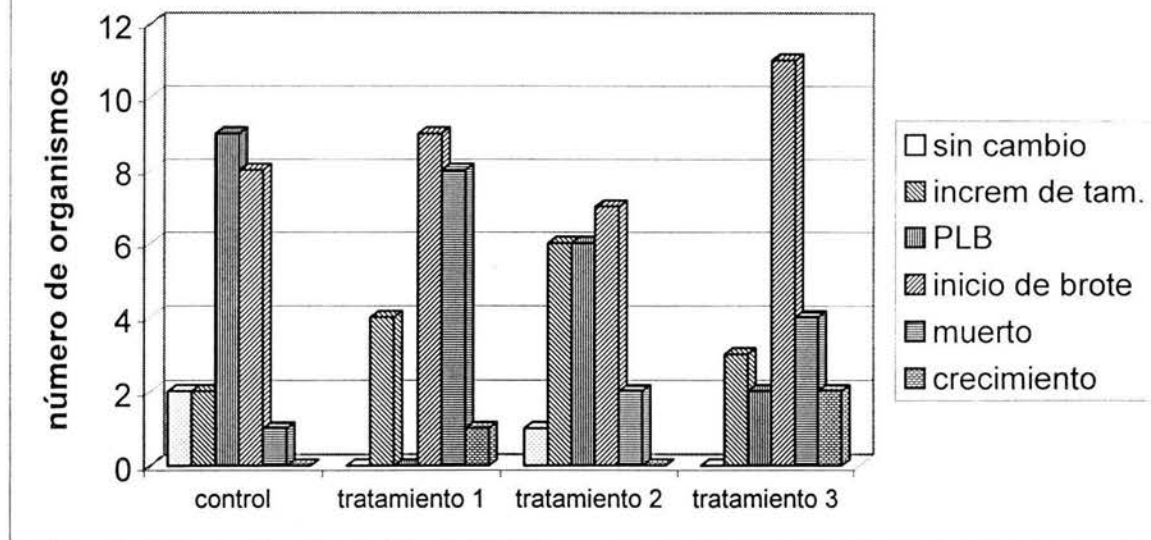


Fig. 13. Respuestas observadas en los protocormos después de 135 días de cultivo, previas a la cuantificación de azúcares totales. Control.- Medio Kc 4003; Tratamiento 1.- Medio K-4003 y agua de coco 20%; Tratamiento 2.- Medio K-4003 y cinetina 0.5 mg/l; Tratamiento 3.- Medio K-4003, cinetina 0.5 mg/l y agua de coco 20%. Las barras muestran la suma de los protocormos.

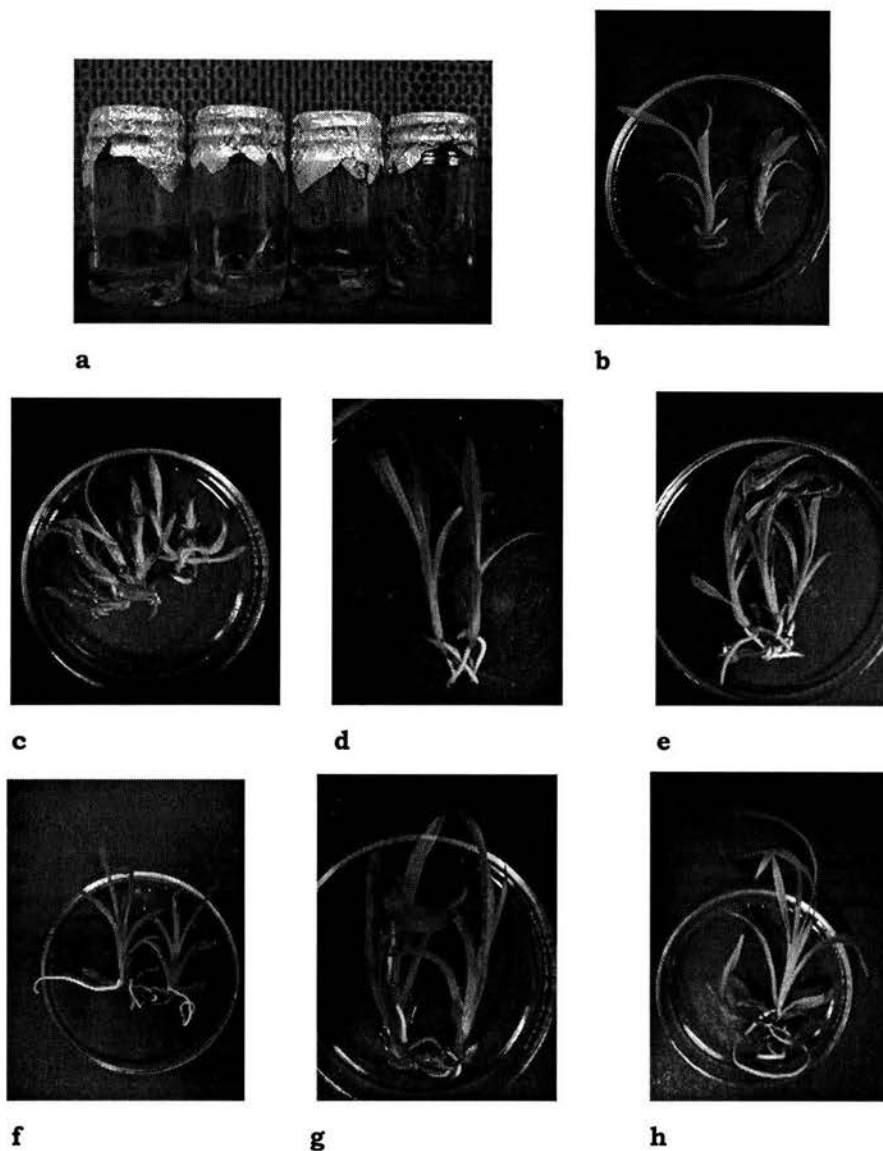


Fig. 14. a) Crecimiento y desarrollo en los 4 tratamientos sometidos a la medición de azúcares. De izquierda a derecha: Medio control, tratamiento 1, tratamiento 2 y tratamiento 3; b) Diferencias observadas en el crecimiento. Izquierda tratamiento 3, derecha tratamiento 1; c) Brotes múltiples obtenidos en el tratamiento 3; d) Brotes obtenidos en el tratamiento 1, a los 180 días de cultivo; e, f, g y h) Plántulas después de 180 días de cultivo en el tratamiento 3 en las que se aprecia la formación de raíces, crecimiento, múltiples hojas y el inicio de formación de pseudobulbos.

A 180 días de cultivo sólo 2 organismos de 88 continuaron sin crecimiento, 17 murieron y 11 incrementaron su tamaño. Los PLB surgieron en 16 protocormos, con una mayor incidencia en el tratamiento 2; 30 de los 88 organismos alcanzaron la fase de brote y 12 de los 88 ya mostraban un crecimiento y desarrollo de estructuras. El único tratamiento que no presentó desarrollo de organismos fue el adicionado con cinetina (tratamiento 2). (Figs. 11. 14 y 15).

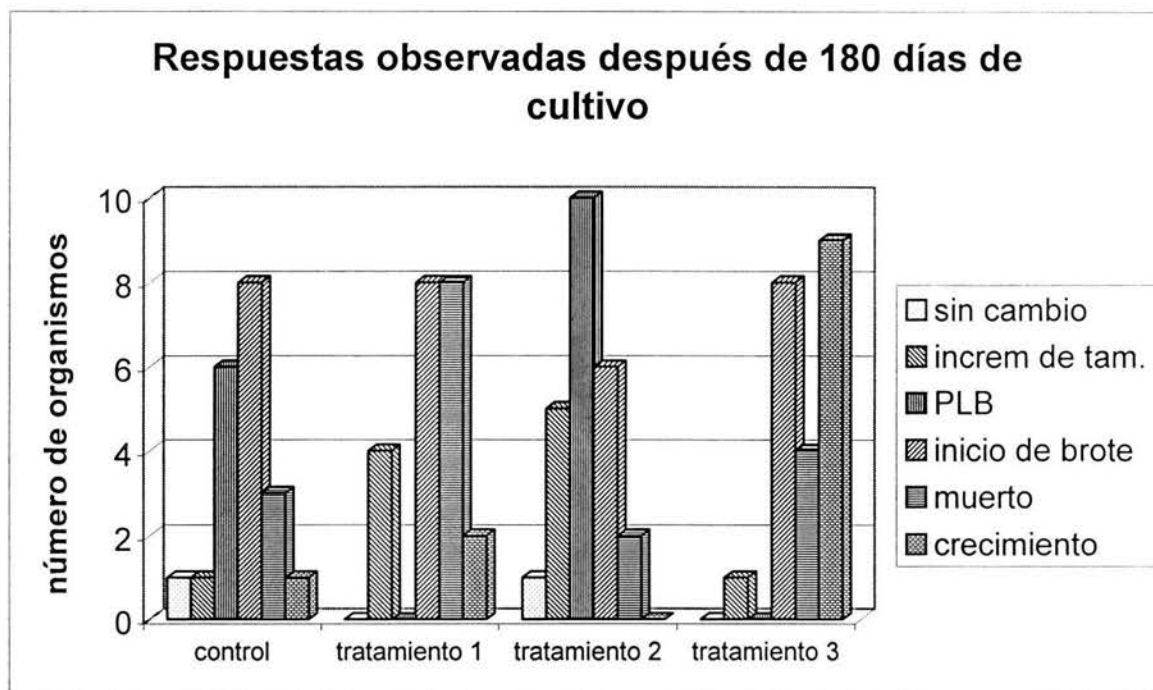


Fig. 15. Respuestas de los protocormos después de 180 días de cultivo, previas a la cuantificación de azúcares totales. Control.- Medio K-4003; Tratamiento 1.- Medio K- 4003 y agua de coco 20%; Tratamiento 2.- Medio K-4003 y cinetina 0.5 mg/l; Tratamiento 3.- Medio K-4003, cinetina 0.5 mg/l y agua de coco 20%. Las barras muestran la suma de los protocormos.

A los 225 días, última fase del experimento, la respuesta mayoritaria fue de desarrollo de plántulas (formación de hojas, raíces y pseudobulbos; 20/88); seguida por la formación de brotes, ya más grandes (25/88). Los PLB continuaron su desarrollo en los tratamientos control y 2 (16/88), 8 con incremento de tamaño, 18 muertos y sólo uno inactivo (Figs. 16 y 18).

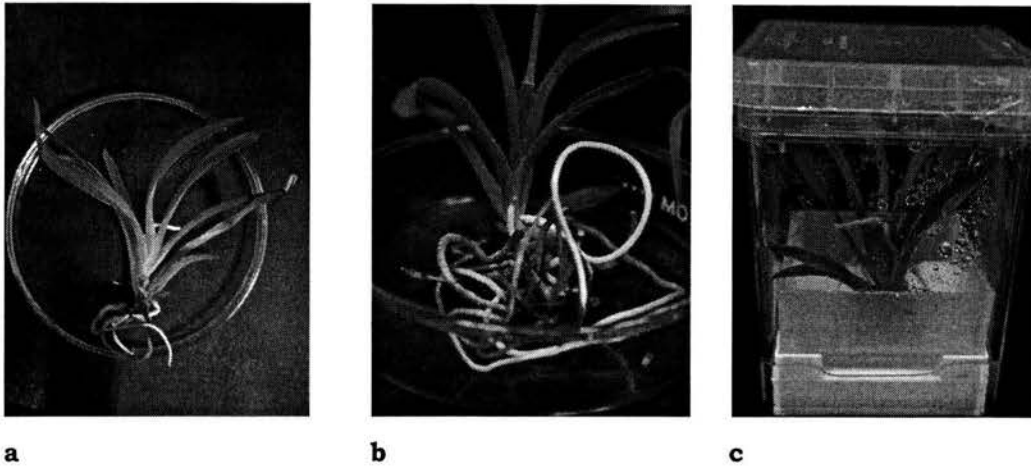


Fig. 16. a, b, y c) Plántulas de *R. bictoniense* después de 225 días de cultivo con sus estructuras desarrolladas, listas para iniciar la fase de aclimatización.

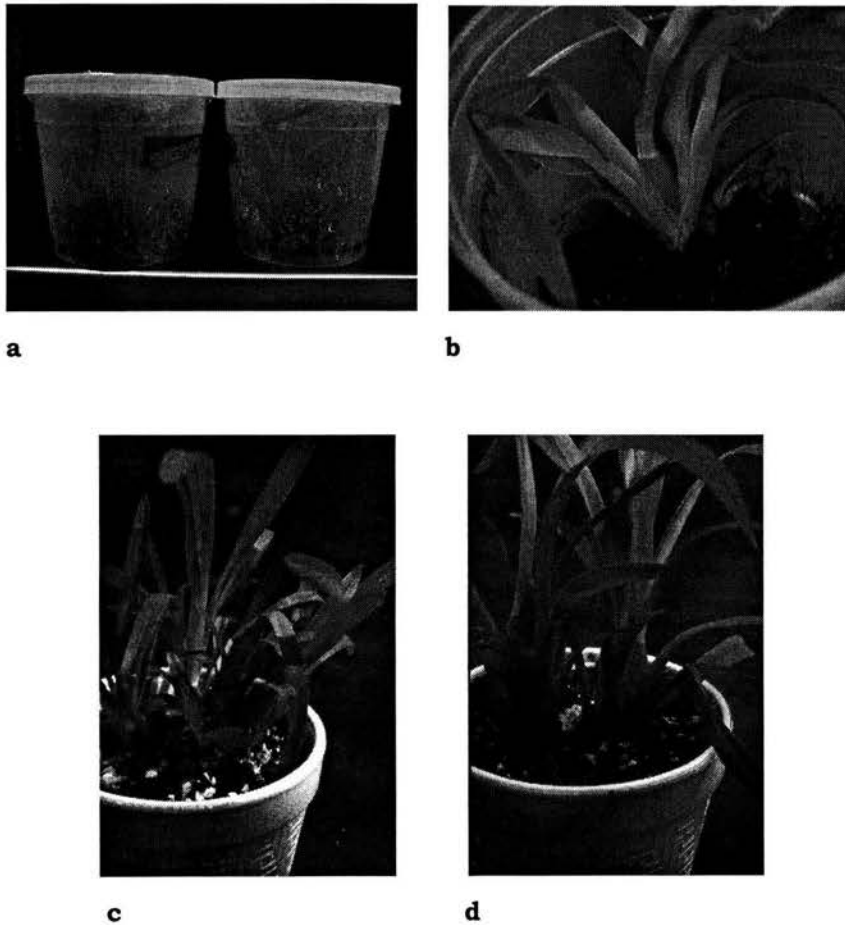


Fig. 17. a y b) Inicio de la fase de la aclimatización donde se colocaron las plantas en sustrato estéril dentro del laboratorio antes de ser transplantadas fuera de este, c y d) Plantas de *R. bictoniense* fuera del laboratorio.

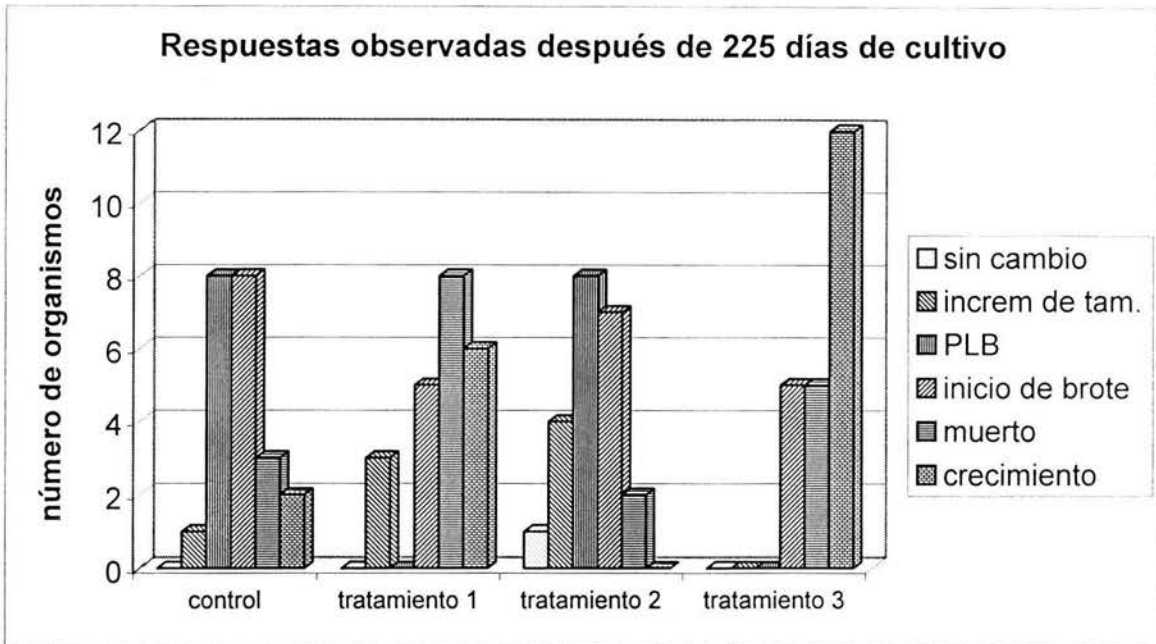


Fig. 18. Respuestas de los protocormos después de 225 días de cultivo, previas a la cuantificación de azúcares totales. Control.- Medio K-4003; Tratamiento 1.- Medio K- 4003 y agua de coco 20%; Tratamiento 2.- Medio K-4003 y cinetina 0.5 mg/l; Tratamiento 3.- Medio K-4003, cinetina 0.5 mg/l y agua de coco 20%. Las barras muestran la suma de los protocormos.

Fig. 19. Diagrama Metodológico para la obtención de *R. bictoniense* a partir de explantes cultivados *in vitro*.

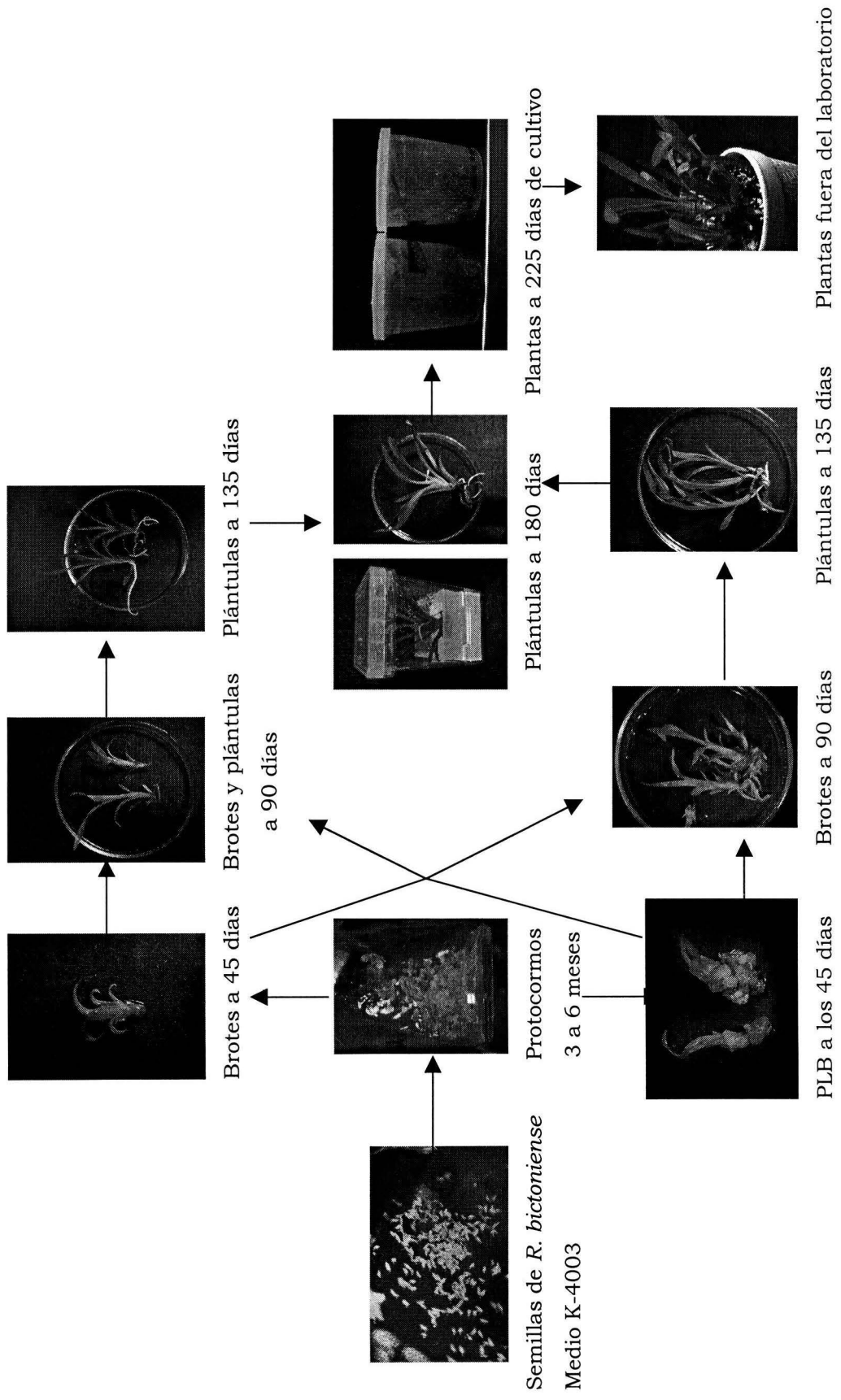




Fig. 20. *Rhynchosstele bictoniense*

8. Análisis de resultados.

8.1. Establecimiento de las condiciones y características para el cultivo de *R. bictoniense*.

La germinación de las semillas de *R. bictoniense* ocurrió entre 3 y 6 meses después de la siembra, razón por la cual al inicio del trabajo se contó sólo con 32 protocormos aproximadamente. Una vez obtenidos éstos, se mantuvieron en condiciones de oscuridad y desecación gradual para su óptima conservación siguiendo el procedimiento descrito por Kishi y Takagi, (1997) a 24 ± 2 °C en el medio Knudson C (Sigma K-4003, Tabla 1 y Figura 1). Los protocormos se sometieron a los diferentes tratamientos para iniciar la fase de multiplicación celular y de generación de brotes. Los protocormos mostraron actividad un mes después de iniciada esta fase. Al observar las diversas respuestas se encontró que los protocormos fraccionados tendían a la oxidación, la cual pudo deberse a que fueron expuestos a una concentración muy alta de cinetina (Hurtado, *et al.*, 1994) (1 mg/l) (Figs. 1, 2 y 3). Esta tendencia a la oxidación también se presentó en los protocormos que tuvieron la concentración baja de la hormona (0.5 mg/l) (Figs. 5 y 6), por lo que no se descarta que otro factor importante para la oxidación de los organismos fue la exposición del tejido fresco a las condiciones del medio de cultivo al momento de ser fraccionados, ya que en el tratamiento en que los protocormos se colocaron enteros, y con la dosis baja de cinetina, la mortalidad por oxidación fue menor. Como parte del experimento se realizó un análisis de varianza, cuyo resultado nos indicó que la mejor condición experimental para el crecimiento y desarrollo de los protocormos de *R. bictoniense* fue el medio K-4003 líquido, en combinación con cinetina 0.5 mg/l y agua de coco al 20%. Esta conclusión se reforzó al observar que los protocormos transplantados a este mismo medio después de 45 días, mostraron un notable crecimiento y desarrollo, dejando muy por debajo las características de los brotes presentadas en los demás tratamientos y eliminándose por completo la oxidación (Fig. 8).

Con el propósito de corroborar la efectividad de este medio de cultivo en el desarrollo de la especie, al obtener más protocormos estos se subcultivaron tanto enteros como fraccionados. Los resultados obtenidos fueron similares a los de la etapa anterior: a los 45 días de cultivo muchos de los organismos enteros no mostraron actividad y los fraccionados comenzaron a oxidarse. Al cambiarlos a medio fresco (cada uno de sus tratamientos), los organismos continuaron con su desarrollo, siendo los enteros los que mayor número de inicios de brotes presentaron. Sin embargo, debido a su etapa inicial de desarrollo, 43 de los 130 protocormos enteros murieron porque el medio de cultivo se contaminó con un hongo; en tanto que la muerte de los protocormos fraccionados continuó siendo en su mayoría por oxidación y clorosis, presentándose también la contaminación aunque posterior al inicio de la oxidación (Figs. 5 y 7).

IZT.



El crecimiento de los protocormos fraccionados fue casi 4 veces menor que el de los enteros, y los brotes de los primeros fueron más pequeños y débiles. (Fig. 8). En esta etapa también se observó que a los 45 días el cambio experimentado en su gran mayoría era crecimiento del protocormo, formación de una a tres hojas, con una talla promedio de 2.8 cm y un peso de 0.15 g y en algunos casos se podía apreciar indicios de formación de raíces y de PLB en la base de los brotes. (Figs. 7 y 8). Los resultados descritos hasta aquí nos permiten asegurar que la combinación agua de coco al 20%/cinetina a 0.5 mg/l probada es un buen aditivo para la multiplicación celular de los protocormos, el incremento de biomasa, la formación de brotes y el enraizamiento de las plántulas.

Los protocormos sometidos a los tratamientos restantes mostraron respuestas similares (Figs. 2, 3, 5, 6 y 7): muerte por oxidación de la mayoría de los organismos fraccionados y presencia de pequeños brotes en los enteros. En ningún caso se observó mejora alguna sobre las respuestas

que presentaron los protocormos enteros sembrados en el medio K-4003 líquido adicionado con agua de coco y cinetina. Estos resultados demuestran que la ausencia de crecimiento de los organismos fraccionados o enteros en los demás tratamientos se debió como ya se explicó, probablemente a la alta concentración de la cinetina (1 mg/l) y posiblemente a la exposición del tejido fresco al aire y/o a la exposición del medio y condiciones de cultivo.

Se ha reportado que el medio KC en su formulación original (Knudson, 1951) permite la germinación de semillas de orquídea, el crecimiento y la generación de brotes y la formación de raíces y PLB (Rubluo, 1993; Wilfred, 1966) . El hecho de que el medio K-4003 rindiese mejores resultados en el crecimiento de los organismos se debe, muy probablemente, al distinto contenido de sales totales y a las diferentes proporciones de N^{+3} , Ca^{+2} , S^{+6} , Mg^{+2} , y Zn^{+2} (Hartmann, 1975; Thompson, 1977). Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los reportados por otros investigadores, quienes demostraron que las modificaciones hechas a la composición del medio KC original, al reformularlo como K-4003, no alteran su utilidad para el cultivo de estos y otros explantes de orquídeas (Ernst y Arditti, 1993) (Tabla 1).

Entre los reguladores de crecimiento más ampliamente utilizados en el cultivo de orquídeas están las citocininas (Krikorian, *et al.*, 1990; Mok, *et al.*, 2000), que se sabe estimulan la división celular. Algunas de las más utilizadas son: BA, 2iP y cinetina –hormona sintetizada químicamente-; el efecto de esta última es mucho más potente que el de la adenina (Hurtado, 1994). Un exceso de hormonas en el cultivo puede producir mutaciones en los protocormos (Lam, *et al.*, 1991), o como en este caso, las combinaciones de citocininas y auxinas no indujeron una mejoría en las respuestas presentadas por lo cual no se incluyen en este escrito.

El agua de coco es ampliamente utilizada en cultivos *in vitro* de orquídeas, ya que aumenta la proliferación de brotes y de protocormos (Arditti, 1993; Krikorian, *et al.*, 1990; Lam, *et al.*, 1991), y se considera un aditivo orgánico rico en hormonas vegetales (auxinas, citocininas y giberelinas) y azúcares (Arditti, 1993). El efecto del agua de coco sobre el crecimiento de los protocormos reportado en este trabajo concuerda con lo reportado por los autores ya mencionados. Adicionalmente, nuestros resultados muestran que la promoción del crecimiento de los organismos por el agua de coco se potencia adicionando cinetina tal y como sucede con el tratamiento 3 (K-4003, 20% de agua de coco y 0.5 mg/l de cinetina) .

La combinación del agua de coco y cinetina como mejor tratamiento en este estudio, se debe muy probablemente a los componentes del agua de coco, entre los que destaca la presencia de auxinas. Se sabe que estas últimas en combinación con citocininas tienen una interacción muy estrecha para la división celular y la diferenciación (Hurtado, 1994), lo cual se pudo constatar en este estudio ya que los tratamientos aplicados utilizando sólo cinetina o únicamente agua de coco no tuvieron los mismos resultados (Fig. 14) por lo que es posible decir que probablemente existe un efecto sumado entre ambas sustancias y que tal vez se da un sinergismo tal y como sucede entre auxinas-citocininas (Hurtado, 1994).

El metabolismo de las citocininas ha sido estudiado recientemente (Mok, 2000) y se han encontrado genes específicos los que dan como resultado la división celular. Sabiendo que existe un sinergismo entre auxinas y citocininas para la división celular y el crecimiento de tejidos y que la variación en sus concentraciones es un factor importante de desarrollo, ya que cuando la concentración de citocininas es mayor ocurre la diferenciación de yemas y brotes (Hurtado, 1994), entonces se puede ver que los resultados obtenidos coinciden con los datos presentados.

Las condiciones de cultivo establecidas en el laboratorio, pueden considerarse adecuadas para inducir la multiplicación de *R. bictoniense*. Las temperaturas máxima – mínima fueron de 25 – 20 °C respectivamente durante todo el tiempo del experimento. Con respecto a la luz, las lámparas utilizadas (Philips, cool white 20W) operaron durante fotoperíodos regulares de 16 horas luz seguidos de 8 de oscuridad, proporcionando una irradiación de 12.2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Aunque en la literatura se ha señalado como óptima una radiación de aproximadamente 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, los organismos presentaron una buena respuesta a la emisión proporcionada en el laboratorio, la cual fue benéfica muy probablemente debido al empleo de envases con tapa de polipropileno transparente, evitando así la reducción de la cantidad de luz, causada por tapas de papel aluminio que comúnmente se usan.

8.2. Análisis del medio de cultivo.

Durante las etapas iniciales de su desarrollo los protocormos obtienen los azúcares del medio de cultivo, hasta que son capaces de fotosintetizar y puede iniciarse la fase de aclimatización separándolas del medio de cultivo, para lo cual fue necesario cuantificar la pérdida de azúcares del medio y así determinar el momento en que ya no necesitan la adición de azúcares. Para ello se midió la concentración de carbohidratos totales.

En la Figura 9 se observan las variaciones en las concentraciones de sacarosa de los medios a lo largo del tiempo para cada tratamiento, así como las desviaciones estándar más grandes por cada uno de los tratamientos, las cuales se agruparon en los datos correspondientes a las primeras mediciones, esto nos hace suponer razonablemente que se debieron a errores de experimentación, los cuales se redujeron conforme pasó el tiempo y la técnica se fue perfeccionando, ya que al realizar las mediciones correspondientes a las demás fechas de subcultivo, sus desviaciones estándar se redujeron en una cuarta parte. Los tratamientos

control y 2 muestran una tendencia similar: durante las primeras fases de desarrollo de los protocormos la concentración de sacarosa disminuye, alcanzando los valores iniciales hasta los 225 días. Sin embargo, a pesar de que a este tiempo los organismos ya no consumían azúcares del medio, no se observó el desarrollo de raíces ni de pseudobulbos, solamente contaban con hojas pequeñas y PLB. Este grado de desarrollo de los organismos imposibilitó el inicio de su aclimatización fuera del laboratorio. Estos resultados demuestran que la sola presencia de cinetina no es suficiente para el desarrollo de los protocormos (tratamiento 2) y mucho menos el medio sin aditivos (tratamiento control) (Figs. 10 a la 15 y 18).

En cuanto a los tratamientos 1 y 3, en las primeras etapas del experimento la concentración de azúcares disminuyó en el medio de cultivo con respecto a los controles y fue similar a los otros tratamientos. Después de los 90 días los medios con el tratamiento 1 muestran un incremento en la concentración de azúcares con respecto a la primera medición, que podemos atribuir razonablemente al agua de coco con la que se preparó el medio, los cuales pueden variar su concentración en ella. Por lo contrario, en los medios del tratamiento 3 disminuyó drásticamente la concentración de azúcares con respecto a la primera medición, mostrando una tendencia similar a la de los demás tratamientos. La formación de brotes en el tratamiento 3 fue la respuesta más frecuente en esta etapa del experimento. Por otro lado, a pesar de la presencia de brotes en los organismos sujetos al tratamiento 1, éstos no fueron tan vigorosos ni de las tallas alcanzadas por los del tratamiento 3. (Fig. 14). A los 135 días las concentraciones de azúcares en ambos tratamientos comenzaron a aumentar de una manera muy similar; reflejo de la disminución del consumo de azúcares por los organismos, ya que comenzaron a adquirir la capacidad de ser autosuficientes (Van Huylenbroeck, *et al.*, 1996) y por lo tanto se liberaron de la dependencia de los azúcares del medio de cultivo.

En esta etapa los valores de azúcares en los medios mostraron una tendencia ascendente comparable a los datos obtenidos en el medio control. Simultáneamente los brotes iniciaron el desarrollo de raíces, el crecimiento y aumento del número de hojas y la formación de pseudobulbos. Los organismos en el tratamiento 3 fueron más vigorosos que los cultivados en el tratamiento 1, lo que nos permitió separar explantes del primero para la formación de nuevas plantas; mientras que en el tratamiento 1 aunque el desarrollo fue evidente, las plántulas y brotes fueron menos vigorosas, y con raíces más pequeñas y en menor número. A los 225 días en el tratamiento 3, se pudieron observar organismos bien desarrollados con la posibilidad de iniciar su aclimatización fuera del laboratorio y de separar nuevas plántulas que continuaran con su desarrollo. (Figs. 10 a la 16 y 18).

Con estos datos se pudo observar que el consumo de azúcares efectuado por los organismos tuvo relación con el crecimiento de éstos y que en las primeras etapas de desarrollo los azúcares son sumamente importantes y consumidos continuamente, permitiendo el aumento de tamaño y la formación de brotes o PLB. Conforme se desarrollan los organismos, su actividad fotosintética aumenta y después de un tiempo ya no es necesaria la sacarosa contenida en el medio de cultivo para su crecimiento óptimo. El mayor número de organismos con desarrollo, de mejor tamaño y posibilidades de iniciar su aclimatización correspondió a los del tratamiento 3 adicionado con agua de coco al 20% y cinetina a 0.5 mg/l. Cabe mencionar que los organismos sujetos a los tratamientos control (sin aditivos) y 2 (cinetina 0.5 mg/l), aunque en un principio mostraron un aumento de tamaño e inicios de brote, desarrollaron solamente un mayor número de PLB; mientras que los del tratamiento 1 (agua de coco al 20%) aunque mostraron buenas respuestas, estas fueron un tanto más lentas coincidiendo a la formación de organismos de menor talla y en general menos vigorosos. (Figs. 7 a 18)

Kishi en 1997 y Vaz en 1998 realizaron estudios de absorción de azúcares en el medio de cultivo por plantas y reportaron que alrededor del 20% de la sacarosa presente es transformada en glucosa y fructuosa, estos datos nos hacen suponer que algo similar sucedió en este estudio ya que las condiciones de esterilización fueron iguales y considerando que los organismos se subcultivaban cada 45 días en medio nuevo, podemos suponer razonablemente que la sacarosa presente fue absorbida por ellos y que nuestras mediciones correspondieron a los azúcares transformados y a los no utilizados por la planta conforme pasó el tiempo.

8.3. Aclimatización

Después de 225 días de desarrollo *in vitro* 12 plantas (de un tamaño entre 10 y 12 cm y con pseudobulbos bien desarrollados, hojas y raíces) fueron extraídas de los envases que contenían medio de cultivo (Fig. 16) y se transfirieron a recipientes de polipropileno con una mezcla de turba (peat moss), agrolita y corteza finamente molida humedecida con agua destilada estéril. Las plantas se mantuvieron en este sustrato durante un mes dentro del laboratorio. Posteriormente éstas se enjuagaron con agua potable para eliminar los restos del medio de cultivo y fueron ventiladas durante dos días en un sitio fresco protegido de la luz solar directa. A continuación los organismos se plantaron en vasos de unicel de 10 x 7 cm, que contenían la mezcla mencionada. El fondo de los recipientes fue acondicionado con tezontle para permitir el drenaje. Las plantas se colocaron dentro de una bolsa de polietileno con una abertura superior para permitir una ventilación adecuada (Fig. 17). Ocho meses después de retiradas del cultivo *in vitro*, las plantas se encuentran en buenas condiciones; las tallas alcanzadas son de 12 a 15 cm, con pequeños brotes y se muestran vigorosas y capaces de continuar su crecimiento en condiciones ambientales de 23°C aproximadamente y ciclos de iluminación natural. A pesar de que en esta etapa no ha habido una evaluación

fisiológica, puede considerarse que el descrito ha sido un buen tratamiento para la aclimatización *ex vitro* de la especie (Fig. 17 y 19).

Rhynchostele agrupa plantas de crecimiento lento. En el campo es posible observar plantas que muestran la primera floración alrededor del quinto y sexto año después de su germinación (Aguirre, com pers.) y se carece de datos cuantitativos de su cultivo *in vitro*, por lo tanto no es posible establecer comparaciones con los datos obtenidos en otros géneros como *Cattleya* (Mauro, *et al.*, 1994) que son plantas más vigorosas y con una mayor biomasa aún en etapas tempranas, lo que nos enfatizó la necesidad de generar más información sobre *Rhynchostele*.

9. Conclusiones.

Los métodos empleados en este trabajo permiten obtener la germinación de semillas, multiplicación de protocormos y posteriormente de plantas de *R. bictoniense*.

El tratamiento con medio K-4003, agua de coco al 20% y cinetina 0.5 mg/l, permitió la mayor estimulación del crecimiento, la formación de brotes, el aumento de número y tamaño de hojas así como la obtención de raíces y pseudobulbos que finalmente formaron plantas.

El agua de coco tiene una gran capacidad de inducir la proliferación de protocormos, de cuerpos parecidos a protocormos (PLB), el aumento de biomasa y el enraizamiento, por lo que debería ser ampliamente utilizada para los fines ya descritos.

Las condiciones de las plantas manejadas *ex vitro* hasta el momento, permiten suponer que su aclimatización fuera del laboratorio es posible bajo el procedimiento seguido y que los resultados serán satisfactorios para un mayor número de plantas.

Las concentraciones de azúcares presentes en el medio de cultivo en las diferentes etapas de desarrollo fueron un indicador acerca del desarrollo y el tiempo más acertado para iniciar la fase de aclimatización.

La concentración de azúcares en el medio está relacionada con el crecimiento y desarrollo de *R. bictoniense*, concluyéndose que a etapas tempranas los azúcares son absorbidos y utilizados en el crecimiento de los organismos. El mayor consumo de azúcares ocurre en etapas intermedias y es en las etapas finales donde se observó que estas concentraciones tuvieron una tendencia similar a las reportadas al inicio

del experimento, indicando que las plantas son capaces de ser autosuficientes.

Es posible suponer que esta metodología pueda adecuarse a otras especies del género *Rhynchostele*, contribuyendo así a su conservación *ex situ*.

10. Referencias.

Adelberg, J. y J. Darling. 1993. *In vitro* membrane treatment accelerates flowering of *Laeliocattleya* (El Cerrito X Spring Fires). Amer. Orch. Soc. Bull. Septembrer. pp. 920-923.

Arditti, J. Y R. Ernst. 1993. Micropropagation of orchids. Wiley N. Y.

Arditti, J., 1984. Physiology of Orchid seed germination. pp. 177-222-In:J. Arditti, Orchid Biology. Review and perspectives vol. 3 Cornell Univ. Press, Ithaca N. Y.

Arteca, R. N. y J. M. Arteca. 2000. A novel method for growing *Arabidopsis thaliana* plants hydroponically. *Physiol. Plant.* 108:188-193.

Cahuantzi, A. C. V., 1998. Propagación *in vitro* de *Oncidium cavendishianum* Batem (Orchidaceae) a partir de explantes de la inflorescencia. Tesis de Licenciatura ENEP Iztacala.43 pp.

Camloh, M., y Gogala, N., 1991. *Platycerum bifurcatum*-adventitious bud and root formation without growth regulators *in vitro*. *Acta Horticulturae. Plant Biotechnology.* 289: 88-89.

Carpenter, M. O. 1988. *Odontoglossum bictoniense* and its híbrids. Amer. Orch. Soc. Bull. 57(12): 1360-1369

Cohen, D., 1995. The culture medium. *Acta Horticulturae. Enviromental Control in Plant Tissue Culture.* 393: 15-24.

Coombs, J., 1988. Técnicas en fotosíntesis y bioproduktividad. Capítulo 6: Medición de la asimilación de CO₂ por las plantas en el campo y el

laboratorio y capítulo 11: metabolismo del carbono. Editorial Futura. México.

Daniels, W., 1996. Bioestadística. México. Editorial Limusa.

Debergh., P. C., 1991. Acclimatization techniques of plants *in vitro*. Acta Horticulturae. Plant Biotechnology. 289: 291-300.

Decoteau, D. R; Kelly, J. W. Y Rajapakse, N. 1997. Use of light quality to regulate horticultural crop morphogenesis-The Clemson University photomorphogenesis research program. Acta Horticulturae. 435: 131-139.

Desjardins, Y., 1995. Photosynthesis *in vitro*-on the factors regulating CO₂ assimilation in micropropagation systems. Acta Horticulturae. Enviromental Control in Plant Tissue Culture. 393: 45-61.

Dressler, R. L. 1981. The Orchids. Natural History and classification. Harvard University Press Cambridge. Massachussets.

Dodds, J. H. y L. W. Robert. 1986. Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press. N. Y.

Ernst, R. 1967. Effect of select organic nutrient additives on growth *in vitro* of *Phalaenopsis* seedlings. Amer. Orchid. Soc. Bull. 36:286-394.

Espinosa, G. A. M. 1998. Efecto de dos medios de cultivo modificados en la proliferación de protocormos de *Rhyncho스테le bictoniense* (Orchidaceae). Informe de Metodología Científica IV. Manuscrito 15 pp.

Fila, G., J. Ghashgaie; J. Hoarau y G. Cornic. 1997. Photosynthesis, leaf conductance and water relations of *in vitro* cultured grapevine rootstock in relation to acclimatization. *Physiol. Plant.* 102:411-418.

Fonnesbech, M. 1972. Organic Nutrients in the Media for Propagation of *Cymbidium in vitro*. *Physiol. Plant.* 27:360-364.

Genoud-Gourichon, C., H. Sallanon y A. Coudret. 1996. Effects of sucrose, agar, irradiance and CO₂ concentration during the rooting phase on the acclimation of *Rosa hybrida* plantlets to ex vitro conditions. *Photosynthetica.* 32(2):263-270.

Ghani, A. K. B. A., H. A. Bt. Haris, y N. B. H. Ujang. 1992. Micropropagation of *Mokara*. *Lindleyana.* 7 (1): 7-11.

Hart, A. M. F. Leslie; H. J. Fisher. 1991. Análisis Moderno de los alimentos. Acriba. España.

Halbinger, F. 1982. *Odontoglossum* y géneros afines en México y Centroamérica. *Orquídea Méx.* 8(2) 155-241. Asociación Mexicana de Orquideología, A. C.

Hew, C. S.; Q. S. Ye y R. C. Pan. 1989. Pathway of carbon fixation in some thin-leaved orchids. *Lindleyana.* 4(3): 154-157.

Hew, C. S. y J. W. H. Young. 1997. The physiology of tropical orchids in relation to the industry. World Scientific Publishing. 331 pp.

Huang, L. C. Kohashi. R. Vangundy y T. Murashige 1995. Effects of common components on hardeness of culture media prepared with gelrite. Society for in vitro Biology. *In vitro Cell. Dep. Biol.* 31:84-89.

Hurtado, D., M., Merino. 1994. Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas. México. 232 pag.

Ichihashi, S., 1989. Seed Germination of *Ponerochis graminifolia*. Lindleyana. 4(4): 161-163.

Ilan, A., M. Ziv; A. H. Halevy. 1995. Propagation and corm development of Brodiaea in liquid cultures. Scientia Horticulturae. 63:101-112-

Karim, B. A., A. Ghani, H. A. Bt. Haris y N. B. H. Ujang. 1992. Micropropagation of *Mokara*. Lindleyana. 7(1): 7-10.

Kerbaux, G. 1991. *In vitro* conversion of *Cattleya* root tip cells into protocorm like bodies. J. Plant. Physiol. 138:248-251.

_____, 1993. The effects of sucrose and agar on the formation of protocorm-like bodies in recalcitrant root tip meristems of *Oncidium varicosum* (orchidaceae). Lindleyana. 8(3):149-154.

Kishi, F. y T. Kougirou. 1997. Efficient method for the preservation and regeneration of orchid protocorm-like bodies. Scientia Horticulturae 68(1997) 149-156.

Kishi, F., y K. Takagi (1997). Analysis of medium components used for orchid tissue culture. Lindleyana 12(3): 158-161.

Knudson, L. 1951. Nutrient solutions for orchids. Bot. Gac. 112:528-532.

Kozai, T., C. Kubota, y B. Ryoung. (1997). Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 51:49-56.

Kramer, J. 1979. *Orchids, flowers of romance and mistery.* Abrams N.Y.

Kraus, M. D., 1984. *Odontoglossum bictoniense* hybridizing. *Amer. Orch. Soc. Bull.* 53(1):4-13

Krikorian, A. D., K. Kelly, y D. L. Smith. 1990. E 18 hormones in tissue culture micropropagation. *Plant Hormones and their role in plant growth and development.* P. J. Davis de Kluwer Academic Publisher. The Netherlands. 593-613

Lam, T. W., R. Ernst, J. Arditti, and S Ichihashi. 1991. The effects of complex additives and 6-(γ,γ -dimethylallylamino)-purine on the proliferation of *Phalaenopsis* protocorms. *Lindleyana.* 6(1):24-26.

Lim-Ho, C. L. y G. C. Lee. 1987. Clonal propagation of *Oncidium* from dormant buds on flower stalk. *Malay Orchid Rev.* 21:48-52.

Majada, J. P.; Fal, M. A. y Tamés R. S. 1991. Vitro culture in liquid media: a requeriment for automatization. *Acta Horticulturae. Plant Biotechnology.* 289: 239-240.

Mandujano, P., M. 1988. Respuesta Fotosintética (Metabolismo acido de las crasulaceas) en *Escontria chiotilla* (Weber) Rose en ambiente controlado. Tesis de Licenciatura. ENEP Iztacala. 51 pp.

Mariani, D. D., G. Lorda, A. P. Balatti. Influencia del amaranto en la producción de α -amilasa empleando *Aspergillus Níger* nrri. Asociación

Argentina de Microbiología. www.drwebsa.com.ar/aam/revbol32/v32-4-04.htm.

Martínez-González, J., A. López-Jiménez, J. P. Cruz-Hernández, A. Delgado-Alvarado. 2001. Poda y época de despunte en cladodios de nopal tunero. *Agrociencias*. 35(2).

Mauro, M. D. Sabapathi y R. A. Smith 1994. Influence of benzylaminopurine and alpha-naphthaleneacetic acid on multiplication and biomass production of *Cattleya aurantiaca* shoot explants. *Lindleyana*. 9(3): 169-173.

Mok, M. C. R. C. Martin y D. W. S. Mok. 2000. Cytokinins: Biosynthesis, Metabolism and Perception. *In vitro cell. Dev. Biol.-Plant*. 36:102-107.

NON-059-ECOL-1194. Diario Oficial de la Federación. 1994. Organó del Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos. Sección primera. Tomo CDLXXXVIII. N. 10. 19 pp.

Obaidul, I., S. Matsui y S. Ichihashi. 2000. Effects of complex organic additives on seed germination and carotenoid content in *Cattleya* seedlings. *Lindleyana*. 15(2):81-8.

Ogasawara, N.; Hancishi, S.; Suzuki, C. y Takagi, H. 1995. The growth and CO₂ exchange of *Cymbidium* protocorm- like bodies related to sugar in the culture medium. *Acta Horticulturae. Environmental Control in Plant Tissue Culture*. 393: 85-90.

Osborne, D. R. 1986. Análisis de los nutrientes de los elementos. Acribia, S. A. España, pp 136-138.

Páques, M., 1991. Vitrification and micropropagation: causes, remedies and prospects. *Acta Horticulturae. Plant Biotechnology* 289: 283-290.

Park, Y. S., S. Kakuta; a. Kano y M. Okabe. 1996. Efficient propagation of protocorm-like bodies of *Phalaenopsis* in liquid medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 45:79-85.

Pierik, R. L. M. 1991. Micropropagation of ornamental plants. *Acta Horticulturae. Plant Biotechnology*. 289: 45-53.

Pierik, R. L. M., P. A. Sprenkles, P. A., B. Van Der Harst 1988. Seed Germination and Further Development of plantlets of *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz, *in vitro*. *Scientia Horticulture*. 34: 139-153.

Pritchard, H. W. 1989. *Modern Methods in Orchid Conservation*. . Cambridge Universiti Press. U. K.

Reinert, J. y M. Yeoman. 1982. *Plant Cell and Tissue Culture. A Laboratory Manual*. Verlin.

Rittershausen, B. y W. Rittershausen. 1979. *Orchids in colour*. Blandford Press, Dorset. pp. 58-59

Rosely, S. y J. E. Dale. 1980. Growth-Regulating Substances and the Growth of Tiller Buds in Barley; Effects of IAA and GA₃. *Journal of Experimental Botany*. 31(124): 1191-1197.

Rubluo, A., V. Chávez, A. P. Martínez y O. Martínez-Vázquez. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. *Biological conservation*. 63:163-169.

Salisbury, F. B. y R. W. Ross. 1994. Fisiología Vegetal. Ed. Iberoamericana. México.

Scardefield, H, T. 1979. *Odontoglossum* Summit. Amer. Orch. Soc. Bull. 48(11):1108-1111

Sharif, R. y J. E. Dale. 1980. Growth-Regulating substances and the growth of tiller buds in barley; effects of IAA and GA₃. Journal of Experimental Botany. 31(124):1191-1197.

Soto, A. M. 1988. Listado actual de las orquídeas en México. Orquídea. Mex. 11:233-277.

Soto, A. M., G. A. Salazar y A. Rojas. 1993. Nomenclatural changes in *Rhynchostele*, *Mesoglossum*, and *Lemboglossum* (Orchidaceae, Oncidinae). Orquídea. Mex. 13(1-2):145-152.

Stewart, J., y J. Button. 1978. Development of callus and Plantlets from *Epidendrum* Root Tips Cultured *in vitro*. Amer. Orchid. Soc. Bull. 47(7).

Tanaka, M. y Y. Sakamshi. 1977. Clonal propagation of *Phalaenopsis* by leaf tissue culture. Amer. Orchid. Soc. Bull. 46:733-737.

Thompson, P. A. 1977. Orchids from seed. Royal Botanic Gardens Kew. Londres.

Van Huylenbroeck, J. M. y J. De Riek. 1995. Sugar and starch metabolism during *ex vitro* rooting and acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* "Petite". Physiol. Plant. 111:19-25.

Van Huylenbroeck, J. M. y P. C. Debergh. 1996. Impact of sugar concentration *in vitro* on photosynthesis and carbon metabolism during *ex vitro* acclimatization of *Spathiphyllum* plantlets. *Physiol. Plant.* 96: 298-304.

Van Huylenbroeck, J. M., A. Piqueras y P. C. Debergh. 1998. Photosynthesis and carbon metabolism in leaves formed prior and during *ex vitro* acclimatization of micropropagated plants. *Plant Science.* 134:21-30.

Van, Overbeek, J., M. E. Conklin y A. F. Blakeslee. 1941. Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos. *Science* 94:350-351.

Vaz., A. P., G. B. Kerbauy y R. C. L. Figueiredo-Ribeiro. 1998. Changes in soluble carbohydrates and starch partitioning during vegetative bud formation from root of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae). *Plant Cell. Tissue and Organ Culture.* 54:105-111.

Wilfred, G. J. 1966. Formation of Protocorm-like Bodies on Excised *Cymbidium* Shoot tips. *Amer. Orchid. Soc. Bull.* October.823-827.

Williams, L. O. 1965. The Orchidaceae of Mexico. Escuela Agrícola Panamericana, C. A.

www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2001/mar-abr/art-4.pdf

Young, P. S., H. N. Murthy y P. K. Yoeup. 2000. Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactors system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 63:67-72.